

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Inhibidores de la germinación como agentes frenantes en  
maltería**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María Teresa Hernández García**

**Madrid, 2015**

T1  
577.1  
HER

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE QUIMICAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322355562

" INHIBIDORES DE LA GERMINACION COMO AGENTES FRENANTES

EN MALTERIA "

62359553X

035000417

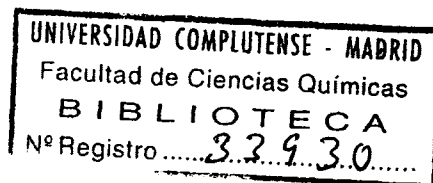
Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor

por

Maria Teresa Hernandez Garcia

Instituto de Fermentaciones Industriales  
del Patronato de Investigación Científica  
y Técnica Juan de la Cierva del C.S.I.C.

Madrid, Mayo de 1975



Mi agradecimiento a :

Dr. D. Angel ~~Martin~~ Municio, ponente de esta Tesis.

Dr. D. José Luis García Bilbao, director de este trabajo.

Mis compañeros.

Y al Instituto de Fermentaciones Industriales del Patronato Juan de la Cierva, por las facilidades dadas para la realización del mismo.

## INDICE

## PARTE TEORICA

	<u>Paginas</u>
Introducción . . . . .	1
Germinación . . . . .	2
Modificación del material de reserva . .	4
Crecimiento . . . . .	15
El letargo en los cereales . . . . .	19
Inhibidores naturales de la germinación .	23
Inhibidores del crecimiento . . . . .	28
Inhibidores de la respiración . . . . .	29
Glucosido tipo Iridoide . . . . .	31
Modo de acción de las auxinas . . . . .	32
Afinidades de los compuestos fenólicos .	34
Transporte activo y sistemas ATP-asicos en las raices de los cereales . . . . .	35

## PARTE EXPERIMENTAL

I.-MATERIALES Y METODOS . . . . .	39
II.-CRECIMIENTO DE EMBRIONES.MICROMALTEADO.	
RESPIRACION . . . . .	55
III.-MODIFICACIONES GENERALES DURANTE LA	
GERMINACION . . . . .	
Separación en columnas de Sephadex . . .	69

	<u>Paginas</u>
Actividad de las amilasas . . . . .	75
Evolución de los lípidos . . . . .	79
IV.-ACTIVIDAD AIA+OXIDASA . . . . .	
Análisis de los extractos de raíz y tallo . . . . .	94
Actividad enzimática . . . . .	101
Cofactores . . . . .	104
Efecto de pH . . . . .	110
Purificación del sistema enzimático . . . . .	112
Fenoles libres . . . . .	122
Purificación de la fracciones proteicas . . . . .	
en Sephadex G-200 . . . . .	123
V.-COMPLEJOS AUXINA QUINONA . . . . .	130
VI.-INHIBIDORES NATURALES DE LA GERMINACION . . . . .	
Acción de las envolturas externas . . . . .	140
Acción de diversos compuestos naturales . . . . .	143
Acción de los hidratos de carbono . . . . .	157
Competición de D-galactosa con D-glucosa. . . . .	163
VII.-ESTUDIO DEL HETEROGLUCOSIDO TIPO IRIDOIDE . . . . .	
Naturaleza del glucosido . . . . .	167
Efecto inhibidor del compuesto en el crecimiento de la raíz . . . . .	172
Acción del glucosido como agente frenante . . . . .	173

	<u>Paginas</u>
Estudio del heteroglucosido en relación con el transporte activo . . . . .	176
Actividad ATP-ásica en las raíces de los cereales . . . . .	178
Influencia del pH y temperatura. . . . .	181
Inhibidores . . . . .	182
Activadores metálicos . . . . .	188
Interacción entre algunos iones . . . . .	189
Conclusiones . . . . .	192
Bibliografía . . . . .	197

## PARTE TEORICA



## Introducción

El desarrollo vegetativo de la planta queda interrumpido por una fase reproductora durante la cual se forman las semillas.

La semilla no comienza a existir en su forma madura ni permanece sin cambiar, sino que tiene un desarrollo gradual y regular que conduce a su madurez ( 1 ).

Inmediatamente despues de su recolección, es decir cuando los cereales han alcanzado la madurez morfologica, los granos de muchas variedades germinan lentamente o incluso no germinan en condiciones optimas, requiriendo cierto periodo de almacenamiento seco antes de alcanzar la energia germinativa normal. Este fenómeno se denomina letargo, y los cambios que tienen lugar en el grano despues de la recolección se conoce como post-maduración.

Los granos de los cereales rara vez se recolectan con los granos fisiologicamente inmaduros, sino completamente viables y la disminución de su energia germinativa es frecuentemente el resultado de la combinacion del letargo natural o primario y del letargo inducido por exceso de agua y conocido por "sensibilidad al agua ( 2 ).

## Germinación

En condiciones apropiadas de humedad, temperatura, luz y su ministro de oxígeno, la semilla absorbe agua a través de las cu biertas y el micropilo, aumentando de volumen.

Iniciada la germinación con la imbibición, las enzimas que degradan las paredes celulares liberan en el endospermo el material de reserva.

El almidón, las grasas y las proteínas se convierten en sus tancias solubles que afluyen al embrión y a cuyas expensas cre- ce con rápido incremento de la respiración.

La aparición de la punta de la radícula a través de las cu- biertas, es el primer indicio visible de la germinación. Teori- camente, la germinación termina con la salida de la radícula, más por conveniencia, se suele alargar su fase de germinación visible con los primeros días del crecimiento.

Es importante considerar que la conducta de la germinación de una semilla puede estar condicionada desde el proceso de fer- tilización y que ciertos procesos parciales deben por ello ocu- rrir mucho antes que la rehidratación del embrión. Todos estos procesos tienen su orden aún cuando un proceso no espere la ter

minación del anterior y sean independientes.

Thimann sugiere que la germinación se desarrolla en cuatro fases, preinducción, inducción y postinducción y fase de la germinación visible ( 3 ).

Composición química de los granos de los cereales

	tanto por ciento				
	Proteína cruda	Lípidos	Fibra cruda	Hidratos de carbono	Cenizas
Avena	10,4	4,8	10,3	58,4	3,1
Cebada	9,4	1,5	4,5	67,4	2,6
Centeno	11,6	1,7	1,9	69,8	2,0

Evans 1960 ( 4 ).

## Modificación del material de reserva.

### Hidratos de carbono.-

La mayor parte de los hidratos de carbono encontrados en la naturaleza se presentan como polisacaridos de elevado peso molecular.

Los polisacaridos de reserva entre los cuales el almidón es el más abundante en las plantas, se deposita en forma de grandes granulos. Los granos de almidón además de materia organica, contienen material mineral (potasio, calcio, silice, fosfato) del orden de 0,12-0,19 por ciento, que localizado al parecer en la superficie de los granos les protege del ataque amilolítico ( 5 ).

Los componentes principales del almidón amilosa y amilopectina, estan constituidos por unidades de D-glucosa unidos por enlaces -glucosidicos, pero mientras que la amilosa constituye una cadena lineal larga con enlaces 1,4, la amilopectina contiene además ramificaciones a traves de enlaces 1,6 dando componentes con mayores pesos moleculares. Tanto la amilosa como la amilopectina dan coloraciones caracteristicas con iodo, mientras que solamente las dextrinas mayores y ramificadas pro

ducen alguna coloración rojiza.

Las enzimas que hidrolizan al almidón conocidas tradicionalmente como  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas, se designan con más exactitud como 1,4,glucan-4-hidrolasa y 1,4,glucan-maltohidrolasa.

La  $\alpha$ -amilasa o endoamilasa rompe los enlaces más centrales y la  $\beta$ -amilasa o exoamilasa atacando por los extremos no reductores libera unidades de maltosa de las cadenas lineales hasta que su acción es bloqueada en los enlaces 1-6 glucosídicos o puntos de ramificación.

Puesto que ninguna de estas enzimas puede hidrolizar los enlaces (1-6) de los puntos de ramificación, el producto final es un núcleo grande y muy ramificado, denominado dextrina límite. Siendo necesario la acción combinada de una  $\alpha$ -amilasa y una  $\alpha$ (1-6) glucosidasa para degradar completamente la amilopectina a maltosa y glucosa.

Las características específicas de estas enzimas (6) hacen preveer los efectos producidos por cambios de pHs y de temperatura.

	pH <sub>optimo</sub>	T <sub>optima</sub>	Destrucción
$\beta$ -amilasa	5	57° C	70° C
$\alpha$ -amilasa	4,7-5,4	70 "	pH menor 4,5
Dextrinasa-límite	5,1	40 "	70° C

### $\beta$ -amilasa

La  $\beta$ -amilasa localizada en la fracción albuminica es soluble en agua y soluciones salinas.

Aunque su pH optimo es de 5, su accion es muy eficaz en el intervalo de 4 a 7.

Sus grupos -SH son indispensables para su actividad y solubilidad. Los metales pesados y agentes oxidantes inactivan la enzima.

Pollock y Pool (7) demostraron la existencia de una  $\beta$ -amilasa latente en la cebada y de una  $\beta$ -amilasa libre. Teniendo estas dos amilasas la misma estructura.

El desarrollo de la  $\beta$ -amilasa se favorece con un alto grado de humedad, 43-45 por ciento y frio de 10-12 °C, destruyendose durante el secado.

### $\alpha$ -amilasa

La actividad de la  $\alpha$ -amilasa aumenta durante la germinación. Daussant y Grabar (8) observaron que la  $\alpha$ -amilasa de la cebada en germinación tiene un determinante antigenico comun con los cereales trigo, centeno, avena y maiz pero no con el arroz.

Los iones calcio son necesarios para su actividad y estabilidad, necesitando una molecula de calcio por molecula de enzima.

ma para su efecto máximo.

Aunque no contiene grupos -SH, es inhibida por los agentes oxidantes.

Frydenberg y Nielsen (9) estudiando las isoenzimas de la cebada germinada encontraron cinco  $\alpha$ -amilasas.

Srivantava y Meredith (10) observaron que la velocidad de síntesis de la  $\alpha$ -amilasa parecía ser función de la cantidad de ácido ribonucleico y que la giberelina aceleraba el metabolismo del RNA y en particular del RNA mensajero.

MacLeod, Duffus y Horsfall (11) pensaron que el ácido giberélico solo no es capaz de inducir una producción máxima de  $\alpha$ -amilasa en la aleurona, necesitando de uno o varios constituyentes del mismo tipo en el embrión.

Durante el malteado, una temperatura de 15°C acelera la formación de  $\alpha$ -amilasa sin cambiar por ello el nivel final.

En general una temperatura fría de 12°C durante la germinación favorece el desarrollo de  $\alpha$ -amilasa, no sufriendo alteración durante el secado.

#### Dextrinasa-Límite

Las enzimas desramificadoras 1,6-glucosidasas se encuentran en las levaduras, mereciendo especial atención una enzima denominada dextrinasa-límite que rompe los enlaces 1,6-glucosí

dicos de las dextrinas libres producidas en la degradación enzimática de la amilopectina, dando azúcares simples fermentables por las levaduras. Esta oligo-1,6-glucosidasa exige que los sustratos contengan a la vez enlaces 1,4 y 1,6 glucosídicos.

Su actividad aumenta paralelamente a la actividad de la  $\alpha$ -amilasa durante la germinación, siendo una característica varietal.

Según Manners y Yellowless (12) los extractos proteícos de avena sin germinar muestran esta actividad enzimática utilizando Pullulan como sustrato, sin aumento durante la germinación.

Los oligosacaridos conteniendo galactosa, se comportan como sustancias de reserva y desaparecen en los primeros días de la germinación.

Dupéron (13) siguió esta desaparición en granos de Crucíferas, manifestando su catabolismo antes que el consumo de las reservas lipídicas, siendo la galactosa el azúcar principalmente utilizado al principio de la germinación de estas semillas.

La utilización preferencial de la galactosa puede corresponder con el aumento de la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa durante la germinación. La utilización de galactosidos se efectúa en relación con otros procesos metabólicos.



## Lípidos

Los cereales contienen de 2 a 5 por ciento de material graso, (14), aislado como una masa amarillenta, cuyos acidos principales son el oleico y linolenico.

Los lípidos desempeñan funciones fisiológicas generales  
1º) como depósitos de reserva intracelulares.

2º) como componentes estructurales de membranas.

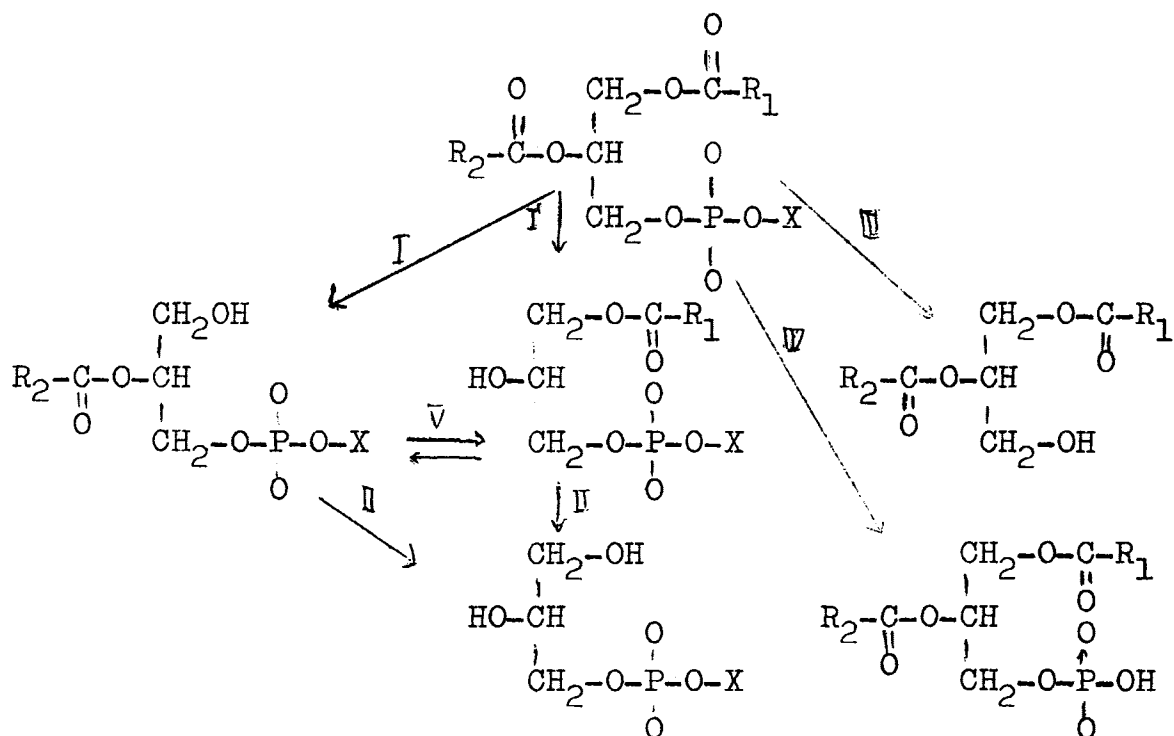
3º) como agentes de protección de paredes.

Los triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos que constituyen la mayor parte de las grasas neutras naturales, son hidrolizadas por acción de las lipasas.

En los cereales las lipasas intervienen al principio de la germinación movilizando los lípidos de reserva requeridos en la respiración.

Los lípidos constitutivos, compuestos complejos polares, se encuentran en la materia viva asociados con otros componentes.

Los lípidos de las membranas citoplasmáticas y mitocondriales son en su mayoría fosfolípidos. Estas moléculas con un grupo fosforilado y un resto apolar de diacilglicerol, presentan cuatro puntos de ataque a la hidrólisis de fosfolipasas específicas.



I Hidrolisis parcial por una fosfolipasa A. Se obtiene un β-acil-liso-fosfolipido.

II Hidrolisis parcial por una fosfolipasa A. Se obtiene un α-acil-liso-fosfolipido.

III Hidrolisis de un fosfolipido por una fosfolipasa B.

IV Hidrolisis parcial por una fosfolipasa C. Se obtiene un α-β-diglicerido.

V Hidrolisis parcial por una fosfolipasa D. Se obtiene el ácido fosfatidico.

VI Isomerizacion entre los dos productos de la fosfolipasa A.

Los galactolipidos, son lipidos an<sup>i</sup>polares con grupos digliceridos unidos mediante enlaces glucosídicos a grupos polares con una o dos moléculas de galactosa.

Biosíntesis de fosfogliceridos.

Los principales fosfogliceridos se forman a partir del acido fosfatídico.

Por una reacción reversible con el CTP el ácido L-fosfatídico se convierte en citidin-difosfato-diacilglicerido, que es el precursor comun de todos los fosfogliceridos formados por esta ruta.

ácido L-fosfatídico + CTP  $\rightleftharpoons$  CDP-diacilglicerido + PP<sub>i</sub>

En las reacciones siguientes, cada una de las cuales es catalizada por una enzima específica, la porción CMP es desplazada por uno de los tres alcoholes siguientes.

CDP-diacilglicerido + serina  $\rightarrow$  fosfatidilserina + CMP

CDP-diacilglicerido + inositol  $\rightarrow$  fosfatidilinositol + CMP

CDP-diacilglicerido + glicerilfosfato  $\rightarrow$  fosfatidil-gliceril-  
-fosfato + CMP

La descarboxilación enzimática del resto serina de la fosfatidilserina conduce a la formación de fosfatidil-etanolamina.

La fosfatidil-etanolamina es el precursor de la fosfatidili

-colina, la cual se forma por transferencia de tres grupos me  
tilo de tres moleculas del donador de metilo S-adenosil-metiou  
nina al grupo amino del resto etanolaminico.

Existe otro camino que conduce a estos fosfogliceridos co  
rrrientes y que permite a organismos que no pueden sintetizar  
colina utilizar directamente la de origen exógeno.

colina + ATP  $\rightarrow$  fosforil-colina + ADP

CTP + fosforil-colina  $\rightarrow$  citidin-difosfato-colina + PP<sub>i</sub>

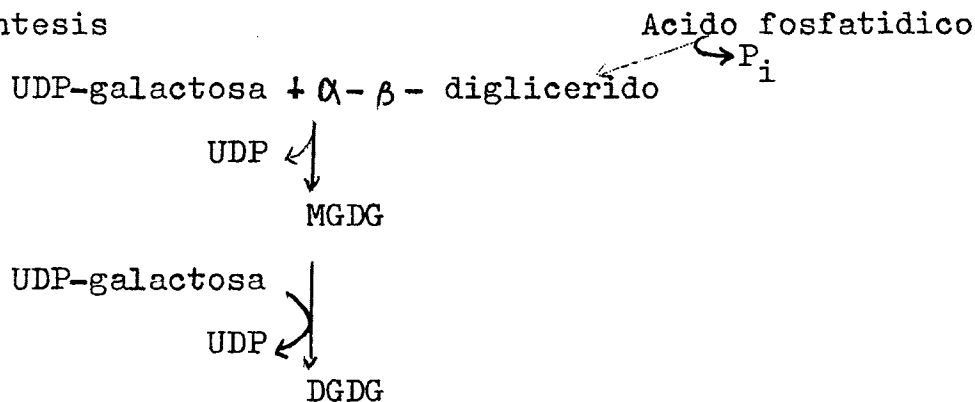
CDP-colina + 1,2-diacilglicerina  $\rightarrow$  fosfatidil-colina + CMP

La fosfatidil-etanolamina se forma por reacciones similares.

Biosíntesis de galactolipidos.

Ferrari y Benson (15) propusieron el mecanismo siguiente.

Fotosíntesis



## Proteínas

Una de las características de las proteínas de semillas es que mientras algunas de ellas son metabólicamente activas, como las enzimas y nucleoproteínas, otra gran parte son metabólicamente inactivas. Estas últimas que varían de acuerdo con la especie constituyen las proteínas de reserva.

La distribución de proteínas metabólicamente activas es similar en la mayor parte de los cereales, cuyo contenido oscila de un 8 a un 12 por ciento.

Las proteínas de reserva en semillas, generalmente tienen un alto contenido en nitrógeno y prolina, siendo bajo en triptofano y metionina.

Estas proteínas son atacadas por un grupo de enzimas proteolíticas que liberan una mezcla de aminoácidos libres junto con las amidas de los ácidos glutámico y aspártico y probablemente péptidos sencillos.

Las proteínas pueden combinarse con los taninos de las envolturas precipitando o coagulando. Al elevar la temperatura a 70°C las fracciones de  $\alpha$  y  $\gamma$  globulinas son parcial o completamente precipitadas sin afectar a la  $\beta$  globulina.

Las proteasas y peptidasas actúan sobre todo durante el malteado. Siendo aproximadamente el 40 por ciento del nitrógeno

no soluble formado, nitrogeno formol.

Las proteasas de la malta presentan una similitud con la papaina y el grupo -SH parece indispensable en su accion.

Sus actividades son máximas en la aleurona y se producen despues de la endo- $\beta$ -glucanasa y de la  $\alpha$ -amilasa.

El ácido giberelico puede aumentar ocho veces la actividad de las proteasas por lo que influye en la formación de aminoácidos, apreciandose en particular el aumento de las cantidades de acidos dicarboxilicos y de prolina, debidos a la degradacion de la hordeina.

La temperatura optima para la degradacion enzimatica de la materia nitrogenada es de 45-50 °C llamada temperatura de peptinizacion y pH óptimo de 4,6-5, siendo rapidamente destruida a 70 °C.

Se conocen dos peptidasas en la cebada con pHs optimos de 7,8 y 8,6 y se inactivan a pH 4,5 perdiendo su actividad a 70 °C.

## Crecimiento

La germinación de las semillas se continua con el crecimiento vegetativo, que se manifiesta por un aumento irreversible de las dimensiones de la plantula como resultado de dos procesos esenciales: elongación y división celular.

Para ello se requiere el transporte de las sustancias de reserva transformadas en sustancias solubles.

Los ácidos grasos libres procedentes de la hidrólisis de los triglicéridos no se acumulan más que temporalmente en los tejidos, la mayoría de estos ácidos no son transportados, siendo catabolizados por la  $\beta$ -oxidación. Por el contrario en el embrión se acumulan los glucidos.

La conversión de los lípidos en azúcares por el ciclo glicolítico en el curso de la germinación de los granos está bien establecida. El carbono de las reservas lipídicas se encuentra en parte en los glucidos y en parte en el  $\text{CO}_2$  respiratorio.

Las materias grasas sirven pues de reservas energéticas y de reservas carbonadas. Así como en el caso de los hidratos de carbono el transporte se realiza en forma de glucosa, en el material de reserva nitrogenado su transporte no se limita a través de uno solo de los aminoácidos, aunque no todos sean transportados en la misma proporción, pues se sabe que las células

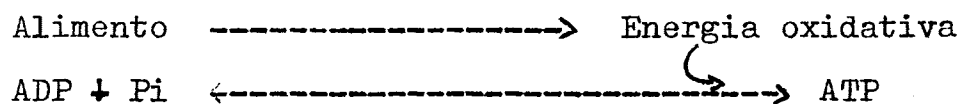
de reserva contienen enzimas que provocan interconversiones de aminoacidos requeridos para producir las mezclas de estos, necesarios para la sintesis de proteinas de las celulas del embrión.

El crecimiento de la planta esta controlado por gran numero de sustancias reguladoras.

Las sustancias que en pequeñas concentraciones regulan una función fisiologica vegetal localizada en un lugar aislado del de su centro de produccion, reciben el nombre de fitohormonas.

Entre las hormonas vegetales, auxinas , giberelinas y cinesinas, consideradas como factores determinantes del crecimento, la auxina ha sido la más conocida y estudiada.

El crecimiento requiere grandes cantidades de energía, ya que la mayoría de los procesos son activos dependientes de la energía metabolica y las sintesis de la pared celular y de las sustancias protoplasmicas son procesos endergonicos. La energia metabolica producida durante la ruptura del almidon, grasas etc es conservada en forma de la energia del enlace fosfato del trifosfato de adenosina (ATP).



Aproximadamente el 90 por ciento del ATP formado en la ce



lula aeróbica proviene de la fosforilación ligada al transporte electrónico. La energía por tanto liberada por respiración intracelular catalizada por las mitocondrias se utiliza para la síntesis del agente transportador de energía (ATP) a través del proceso conocido como fosforilación oxidativa.

Los agentes conocidos como desacoplantes de la fosforilación oxidativa permiten que la oxidación del alimento se realice sin fosforilación, descargando además completamente todos los compuestos con enlaces ricos de energía.

Por ello estos compuestos:

a) estimulan la respiración de las mitocondrias. b) inhiben completamente la síntesis de ATP y c) activan la hidrólisis del ATP adicionado a las mitocondrias. Consecuentemente, la energía libre del proceso oxidativo se libera en forma de calor sin que pueda ser utilizada por los procesos endergónicos.

## Respiración

La oxidación enzimática de las sustancias de reserva produce energía y anabolitos, necesarios para las diversas síntesis de la materia viva.

El valor del cociente respiratorio  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  puede indicarnos la naturaleza del sustrato oxidado.

En el estudio de la germinación de las semillas se ha com

probado que durante algun tiempo el cociente respiratorio de las semillas amilaceas permanece proximo a la unidad, mientras que semillas oleaginosas lo dan inferior.

La conversión de alguna fracción de lípidos en glucidos requeriendo un consumo de oxígeno sin la compensación de un desprendimiento de  $\text{CO}_2$  modifica los resultados.

En el malteado debe tenerse en cuenta el Efecto Pasteur, considerando que para cada concentración parcial de  $\text{O}_2$  se produce un cierto desprendimiento de  $\text{CO}_2$ . La difusión del oxígeno es primordial y su disminución puede provocar estados de anaerobiosis.

En la germinación de ciertas semillas activamente respirantes se deshacen las gruesas paredes del endospermo constituidas de hemicelulosas, ya que pueden utilizar tanto galactosa, fructosa y manosa como sustratos por conversión en una de las hexosas fosforiladas de la cadena de la glicólisis.

La formación de las incrustaciones de pentosanas en las paredes celulares, comprende la epimerización de la UDP-glucosa.

UDP-glucosa  $\rightarrow$  UDP-galactosa  $\xrightarrow{\text{NAD}}$  UDP-acido galacturonico  $\xrightarrow{-\text{CO}_2}$  UDP-arabinosa  $\rightarrow$  Arabinos.

## El letargo en los cereales

El analisis comparativo entre los cereales nos revela que la avena comun presenta una mayor sensibilidad al agua, que no depende solamente de la limitación de entrada de oxigeno al embrión causada por sus envolturas externas embebidas, sino tambien por su mayor contenido en sustancias inhibidoras.

El estudio de la influencia del clima (humedad, temperatura), durante las ultimas fases de maduración del grano en relación con su estado de letargo nos revela que los estados de letargo más profundos estan relacionados con ambientes humedos y relativamente bajas temperaturas.

La cebada recolectada en zonas secas y tiempos calurosos apenas si presenta estado de letargo, alcanzando en la espiga su maduración morfologica y fisiologica. Lo que parece indicar que los compuestos inhibidores de la germinación formados en sus envolturas verdes se modifican con mayor rapidez en condiciones secas y soleadas.

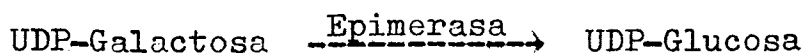
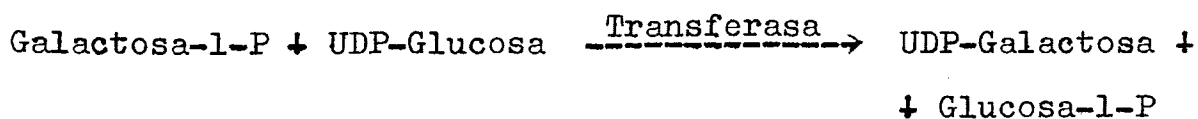
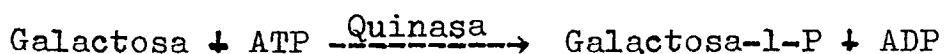
Parece, por todo ello, claro que alguno de los inhibidores de la germinacion se producen en las partes verdes de las plantas gracias a la energia fotosintetica producida en los cloroplastos. Estos compuestos solubilizados en forma de glucosidos son transportados a los distintos organos de la planta, en don

de al liberarse por hidrolisis enzimatica participan en alguna actividad.

Tambien durante la maduración morfologica de los granos se producen, junto al armazon celulosico de las paredes celulares, rellenos de los espacios intermicrofibrilares con sustancias diversas de estructura amorfa, pectinas, hemicelulosas y ligninas. Mientras que las ligninas pertenecen a polimeros derivados de fenilpropanoides  $C_6-C_3$ , las pectinas y hemicelulosas estan comprendidas en el grupo de los polisacáridos y las ultimas constituyen incluso reservas nutritivas, donde la galactosa es el hidrato de carbono común.

Los precursores de la lignina (ácido ferulico, clorogénico etc) y sus productos de degradacion tienen un papel importante en el letargo y germinación de la semilla.

Por otra parte la galactosa puede convertirse en glucosa a traves de la siguiente serie de reacciones.



## Causas del letargo en las semillas

El letargo en las semillas vivas se define como la inhabilidad de crecer cuando todas las condiciones ambientales son favorables, es decir dependientes de circunstancias internas reversibles (1).

Aunque sea el embrión, el órgano germinativo, se habla de letargo de la semilla, ya que es difícil precisar si la ineptitud de una semilla a la germinación es el hecho de un letargo embrionario o de una inhibición tegumentaria.

Durante el período de postmaduración la semilla alcanza la madurez fisiológica y para ello deben ocurrir cambios físicos o químicos en el interior de las semillas o de sus envolturas, y como consecuencia puede alterarse la composición de los materiales presentes, cambiar la permeabilidad de las envolturas o desaparecer algún inhibidor natural.

En contraste a aquellas semillas recién recolectadas, con letargo primario, que requieren un período de postmaduración para germinar, otras semillas morfológica y fisiológicamente maduras pueden perder su disposición para germinar. Este fenómeno se denomina letargo secundario y puede desarrollarse espontáneamente en las semillas debido a cambios reversos ocurridos durante la postmaduración. Algunas veces este letargo es

inducido si a las semillas se les aplica todas las condiciones requeridas excepto una.

El letargo inducido por exceso de agua se conoce por sensibilidad al agua de las semillas y se corrige por tratamiento con oxígeno puro o eliminación de sus envolturas externas.

Pollock y col. muestran que los granos de cebada no exhiben sensibilidad al agua en presencia de bajas concentraciones de agua oxigenada aunque requieran mayores concentraciones para elevar la energía germinativa de los granos con letargo primario.

Una semilla enterrada profundamente no puede germinar debido a la falta de una ventilación adecuada, baja tensión de oxígeno o alta de anhídrido carbónico, pero si bajo estas condiciones llega a alcanzar el estado de letargo, se conserva durante mucho tiempo y si más tarde afloran a la superficie debido a las labores de cultivo, pueden germinar. Tal es el caso del letargo profundo adquirido por semillas de malas hierbas.

Otro caso frecuente en la naturaleza que inhibe la germinación sin afectar a la semilla irreversiblemente es la inhibición osmótica.

La semilla, con sus envolturas externas semipermeables o selectivas, sumergidas en una solución acuosa se comportan co

mo una celula osmotica. Si el potencial osmótico del medio externo es de tal magnitud que limita el contenido de agua de la semilla por debajo de su requerimiento la semilla no germinará o disminuirá el porcentaje de germinación.

Las causas responsables del alto potencial osmotico del medio seran compuestos poco permeables por su tamaño o solubilidad o su naturaleza iónica, por ejemplo polisacaridos, sales inorgánicas etc.

En el laboratorio, el uso de compuestos que no penetran las membranas naturales como manitol e insulina, son junto con las sales inorgánicas, las mas empleadas para determinaciones experimentales, pudiendo observarse diferencias debido a la toxicidad iónica de las sales.

La semilla sin letargo, tomada una cantidad minima de agua, puede iniciar la germinación , pero cuando el porcentaje de germinación obtenido no sea extrictamente una funcion del agua tomada en condiciones favorables para la germinación, y comprobado que el pH del medio está dentro de los limites adecuados, debe pensarse en la existencia de compuestos inhibidores de la germinación en el medio.

## Inhibidores naturales de la germinación

Un gran numero de sustancias pueden inhibir la germinación. Todos aquellos compuestos que son generalmente tóxicos a los organismos vivientes pueden tambien a concentraciones tóxicas, inhibir la germinación, simplemente matando la semilla.

Los compuestos que pueden inducir letargo, por tanto no deben afectar a la semilla irreversiblemente, es decir, que eliminado el inhibidor durante el periodo de postmaduración o contrarrestada su acción por promotores de la germinación, esta podra germinar de nuevo.

Los inhibidores de la germinación pueden ser definidos como sustancias naturales producidas por las plantas o sustancias semejantes, capaces de inhibir o retardar la germinacion de las semillas sin perdida de su capacidad germinativa. Por supuesto, no todas las semillas seran igualmente sensibles al mismo inhibidor.

La naturaleza química de la mayoria de los inhibidores, puestos de manifiesto mediante ensayos biológicos es aun desconocida. Siendo aisladas gran variedad de estas sustancias inhibidoras de los distintos organos de las plantas, especialmente de semillas y frutos.



## Clasificación

Aldehidos.- En general, todos los aldehidos son inhibidores de la germinación. El acetaldehído es un potente inhibidor y puede ser liberado por las semillas inmaduras de guisantes y de maiz y en semillas sumergidas en los medios.

Los aldehidos de compuestos fenólicos son los más conocidos, por ejemplo vanillina, aldehído salicílico, etc.

Acidos orgánicos.- Independientemente de su influencia en el pH del medio, Varga indica como esenciales a los ácidos orgánicos de cadena corta (ácidos maleico, cítrico, acético) y a los ácidos aromáticos.

Los ácidos aromáticos son compuestos muy frecuentes en todos los órganos de las plantas. Entre ellos, los ácidos cinámicos y sus derivados fenólicos (ácidos ferulico, cafeico) son los más estudiados.

Aminoácidos.- Los aminoácidos pueden ejercer alguna función inhibidora de la germinación. El estudio detallado de las fracciones inhibidoras de cariópsis inmaduros de trigo realizados por Hubac pone de manifiesto que la prolina es el principal contenido en el albumen.

La hidroxiprolina y el triptófano también han sido mencionados como inhibidores de la germinación.

Lactonas insaturadas.- La cumarina puede inducir sensibili-dad a la luz en variedades de semillas de lechuga que no requerían luz para su germinación. La cumarina y sus derivados se encuentran muy extendidos en la naturaleza. La escopoletina es un inhibidor importante natural de la avena.

Ftalidas.- También presentan acciones inhibitoras. La hidroxiftalida ha sido aislada de granos de avena.

El ácido parasórbico y la anemonina son también inhibido-res de este tipo.

Sustancias gaseosas y volátiles.- El ácido cianhídrico se libera por hidrólisis de la amigdalina, heterósido contenido por las semillas de las Rosáceas.

El amoníaco es un inhibidor muy fuerte y puede liberarse mediante hidrólisis enzimática de compuestos nitrogenados.

El etileno emitido por maduración de los frutos carnosos también puede tener alguna acción inhibitora e igualmente se puede decir de las esencias de mostaza liberadas de los hete-rosidos de semillas de crucíferas.

El complejo inhibidor de los jugos de diversas plantas pa-rece corresponder al inhibidor de Bennet-Clark y Kefford, pre-sente en numerosos órganos con letargo y en los cariopsis inmaduros de trigo. Puede ser atribuida una parte de su activi-

dad al ácido abscísico.

Evenari (16) menciona a los alcaloides como frecuentes inhibidores de la germinación.

Además, ciertos compuestos flavónicos, como la Naringerina, y naftoquinónicos, como la junglona, cuyos efectos tóxicos pueden ser reducidos por glicosilación de uno o más grupos hidroxilos.

#### Modo de acción

Los fenómenos de inhibición de la germinación son complejos, y por ello, la regla de los inhibidores poco conocida.

Las mismas sustancias que son inhibidoras a altas concentraciones pueden estimular cuando están convenientemente diluidas. Inhibición y estimulación son efectos causados por sustancias diferentes, de cuyo balance en los extractos crudos depende la acción total.

El inhibidor puede sufrir modificaciones en la composición química que conduzcan a la pérdida de su actividad inhibidora e incluso convertirse en estimulante.

Aunque la presencia de sustancias inhibidoras en los extractos sea buena orientación, es preciso recordar con Thiman que ello no prueba con certeza la existencia de tal función "in vivo".

## Inhibidores del crecimiento

Conociendo que el crecimiento es un fenomeno complejo conviene considerar la acción de los compuestos quimicos sobre a aquellos procesos más conocidos que posteriormente se pueden integrar.

El transporte del agente al interior de las celulas embrionarias es el primer proceso a considerar. En algunos casos se requiere un transporte activo y en otros incluso la fosforilacion del agente por el ATP.

La división celular es proceso que requiere la sintesis de DNA y la fosforilación oxidativa, de tal forma que la velocidad del desarrollo mitotico está relacionado con el nivel de ATP.

El aumento de la respiración durante el crecimiento pone de manifiesto que los procesos anabólicos superan a los catabólicos y que la mayor parte de esta energia proviene de la fosforilación oxidativa.

Por ello ha de tenerse en cuenta todos los inhibidores de la respiración y desacoplantes de la fosforilación oxidativa.

## Inhibidores de la respiración

En las plantas superiores, si bien algunos de sus tejidos pueden soportar temporalmente anaerobiosis, con frecuencia, no pueden vivir en anaerobiosis completa.

La respiración utiliza generalmente la glicolisis como primera fase para ello los inhibidores de la enolasa y de la triofosfatodeshidrogenasa impiden la respiración en presencia de glucosa, a condición de que el ciclo de las pentosas sea inoperante, pero no impiden la respiración en presencia de piruvico.

En la germinación de las semillas oleaginosas se realiza también el ciclo del glioxilato.

Lípidos  $\xrightarrow{\quad}$  Ácidos grasos  $\xrightarrow{\quad}$  Acetil CoA

Glúcidos  $\xrightarrow{\quad}$  Fosfopiruvato  $\xrightarrow{\quad}$  Succinato

Por otra parte los inhibidores de la cadena respiratoria terminal, como cianuro, pueden impedir la oxidación con aparición de alcohol, tóxico cuya oxidación en las plantas se hace con dificultad.

Los compuestos disociados penetran con dificultad en las células y por ello el ácido malónico a pH 7 no inhibe la respiración de células de zanahoria.

## Inhibidores de la fosforilación oxidativa

Los desacoplantes típicos 2,4-dinitrofenol, dicumarol, ácido salicílico etc, suprimen la producción de ATP pero incluso intensifican el desprendimiento de  $O_2$  agotando las reservas sin renovación.

Parece igualmente, que cuando la oxidación del ácido ascórbico y la polifenoloxidasas suplantadas al sistema citocromo-oxidasas, la producción de ATP se encuentra afectada.

## Antimitóticos

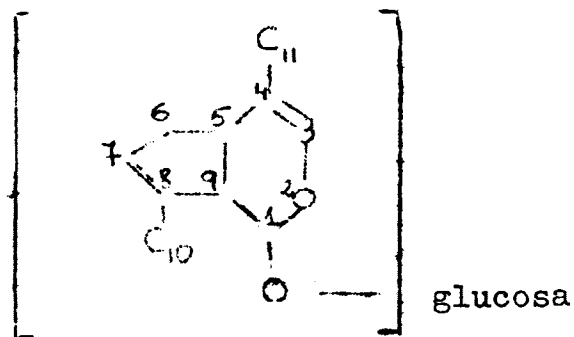
Entre los antimitóticos sencillos son de gran interés aquellos compuestos altamente reactivos, como agentes alquilantes (di(2cloroetil)metilamina, -propiolactona etc) que por combinarse rápidamente con los centros nucleofílicos del DNA o de sus precursores producen aberraciones cromosómicas independientemente de los procesos oxidativos.

Otros de gran reactividad son la hidroxilamina y la hidracida maleica. El primero reacciona con la citosina y el segundo parece deber su actividad biológica al hecho de reaccionar con los grupos sulfidrilos.

## Glucosido tipo Iridoide

Analizadas las semillas de malas hierbas de sembrados y prados, capaces de sumirse en letargos profundos, se advirtió la presencia de inhibidores de la germinación y del crecimiento.

De las plantas de la familia de las Escrofulariaceas se ha aislado un heteroglucosido "tipo Iridoide" (17) que se caracteriza por contener un anillo ciclopentanopirano, donde el grupo hidroxilo del C-1 se halla unido a la glucosa por un enlace glucosídico.



Estos compuestos contienen ácido benzoico en forma de ester, que se libera por saponificación. Correspondiendo los máximos de absorción a 230 y 273 nm a este ácido.

La determinación de la estructura química de este compuesto se realiza en el Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química Orgánica.

## Modo de acción de las auxinas

Las auxinas son capaces de estimular los dos procesos esenciales del crecimiento, pero aún se desconoce su modo de acacción.

Se estudia su intervención a nivel de membrana en el proceso de elongación y se orientan las investigaciones hacia una modificación de los factores de la síntesis proteica o nuecleoproteica con respecto a la división celular.

Por otra parte se conoce la destrucción oxidativa de las auxinas naturales por el sistema AIA-oxidasa, que al no destruir los compuestos sintéticos auxinomiméticos se acumulan y llegan a ser tóxicos (herbicidas), así como la distinta sensibilidad de las células de raíces y de tallos frente a una misma concentración externa de la auxina.

## AIA-oxidasa

El mecanismo regulador de la concentración endógena y libre de la fitohormona ante las exigencias fisiológicas del organismo vegetal nos lleva ante los dos problemas fundamentales.

Anabolismo auxínico, biosíntesis, y catabolismo auxínico o biodegradación.(18).

Entre las enzimas responsables del catabolismo de las au-



xinas y ciertas hormonas vegetales por ejemplo las giberelinas existen toda una serie de relaciones. La modificación del catabolismo auxínico y por tanto del nivel endógeno de la auxina no depende solamente de las enzimas sino también de las actividades de los sistemas donde gran número de factores ejercen sus acciones positivas y negativas.

La enzima responsable de la degradación de la fitohormona en los cereales no ha sido aislada, pero se conoce mejor la acción de las oxidasas y su participación en este fenómeno.

#### Formación de complejos.

Ciertos compuestos orgánicos reaccionan en frío con la auxina formando complejos moleculares (19), en los que las moleculas están unidas por una débil fuerza de valencia secundaria, la cual no puede considerarse como un enlace claramente definido. Estas moléculas, pueden reaccionar a mayor temperatura, formando un complejo orgánico estable.

El complejo AIA-ácido aspártico puede servir de tipo de una serie de complejos formados por la unión de la auxina y de un aminoácido (amida ó polipeptido) e igualmente podemos considerar a los complejos auxina-quinona.

## Afinidades de los compuestos fenólicos

Los complejos moleculares orgánicos formados por el ácido indol acético y los difenoles, ya puestos de manifiesto en 1961 por Leopold y Pulmer (20), son muy poco estables y su observación indirecta puede revelarnos las distintas afinidades de los compuestos fenólicos. La auxina determinada por el reactivo de Salkowsky se oxida a un compuesto rojizo valorado colorimetricamente, siendo enmascarada por la presencia de difenoles. Logicamente, debe tenerse en cuenta la reactividad y el poder reductor de estos compuestos, aunque el hecho de que sus formas oxidadas (quinonas) a las mismas concentraciones produzcan efectos similares, nos induce a considerar que la formación del complejo con la auxina estabilizado por la reacción sea la causa principal del enmascaramiento.

## Transporte activo y sistemas ATP-asicos en las raices de los cereales

La absorción de sales por la raiz se realiza a traves de los mecanismos (21) :

Difusión  $\longleftrightarrow$  Cambios iónicos  $\longrightarrow$  Absorción activa

El cambio cationico puede efectuarse tambien por contacto directo de la zona pilífera con particulas del suelo que contengan cationes intercambiables, especialmente por el ion  $H_3O^+$  procedente de la respiración de la planta.

Los pelos absorbentes funcionan, en efecto, como verdaderos cambiadores de iones y su capacidad de cambio cationico es mucho mayor en las plantas dicotiledoneas que en las monocotiledoneas.

Los fenomenos de difusion y de cambio ionico se localizan en el espacio libre celular y es un proceso reversible.

La absorcion activa especifica es un proceso irreversible y requiere energia metabolica.

Los procesos competitivos, antagonicos e incluso sinérgicos entre iones desarrollan la teoria de los transportadores.

La posibilidad de una acumulación apreciable de sales limitada a las celulas de crecimiento o por lo menos en las que no han perdido esta capacidad conceden credito a los sistemas que

se fundamentan en la intervención del ATP o de las moléculas ricas en energía que provienen de él, para la síntesis o activación de los transportadores.

Un fenómeno de carácter tan polarizado como la permeabilidad y transporte celular requiere por su carácter endergónico energía metabólica mediante la intervención del ATP y mecanismos adecuados.

El transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de membranas celulares animales está fuertemente asociado con la hidrólisis del ATP envolviendo la fosforilación de algún compuesto intermedio. Skou identificó a las ATP-asas transportadoras de iones cuyas actividades requieren  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  en determinadas proporciones y son inhibidas por los glucosidos cardíacos.

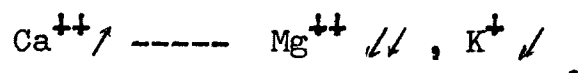
Así, la ATP-asa de la membrana orientada convenientemente puede efectuar el mecanismo de transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

Las membranas citoplasmáticas de diferentes microorganismos contienen también ATP-asas con ciertas propiedades en común pero distintas de las descubiertas por Skou y por supuesto de las más estudiadas ATP-asas mitocondriales relacionadas con la fosforilación oxidativa.

Los fenómenos de sinergia y antagonismo al nivel de iones se produce ya en los procesos de absorción.

En las plantas se conoce de antiguo el hecho de que la presencia de  $K^+$  en el medio de cultivo generalmente modera la absorcion del  $Na^+$ , asi como el antagonismo entre el  $Ca^{++}$  y los metales alcalinos.

Un exceso de  $Ca^{++}$  origina tambien carencia de  $Mg^{++}$



Otro ejemplo clasico es el antagonismo Fe/iones metalicos que puede provocar carencias inducidas. En el caso Fe/Mn se ha pensado que un exceso de Mn puede mantener al Fe en estado oxidadado e inactivo en las plantas.

La influencia del pH del medio juega tambien un papel im-potante en estos procesos.

El estudio de la actividad ATP-asica conjunta en raices de distintos cereales, ha permitido suponer especificidades nutritivas bien determinadas.

## PARTE EXPERIMENTAL

## I.-MATERIALES Y METODOS

## Materiales

Granos de cebada cervecera (Pallas), centeno (Petkus), trigo (Ariana) y avena (Oro II) recolectados en Castilla, seleccionados y esterilizados.

Las semillas germinan asepticamente en cajas/petri esterilizadas en autoclave con papel de filtro como soporte.

La germinación se efectua a temperatura ambiente (18-20°C) ó 28 °C en estufa, durante veinticuatro, cuarenta y ocho ó se tenta y dos horas.

## Extracto enzimático crudo

Para la obtención del extracto enzimático crudo se trituran granos naturales, plántulas, raíces o tallos del correspondiente cereal, que se recogen en un volumen determinado de H<sub>2</sub>O, NaCl 0,15 M ó solución tamponada.

Por centrifugación a 2000 g durante 15 minutos se separa el supernadante que contiene la preparación enzimática.

## Purificación del extracto enzimático crudo

### a) Tratamiento con carbón activo

El extracto crudo tratado con carbón activo mediante agitación durante 15 minutos, se filtra a traves de papel de



filtro Albert nº 242 para eliminar completamente el carbón. Con este tratamiento de separación de compuestos macromoleculares y poco disociados se prepara un sistema enzimático libre de compuestos fenólicos.

b) Elución a través de columnas de Sephadex

La separación de la fracción proteica de los demás compuestos del extracto se realizó en columnas de 2x50 cm, cargadas con Sephadex G-50 ó G-200 Fine hasta una altura de 42 cm, equilibradas a baja temperatura con solución tamponada de fosfatos 22 mM pH 6,8.

c) Dialisis

El extracto crudo en saco de dialisis Sigma, frente a una solución tamponada durante un periodo de tiempo determinado, nos permite obtener un extracto libre de pequeñas moléculas de soluto.

Lípidos totales

La extracción de lípidos totales se realizó con cereales en distintos estados de germinación, según el procedimiento de Bligh y Dyer (22). Para granos completos se utilizaron 50 unidades, y 100 unidades se cortaron de forma que el embrión quedase intacto y con la menor cantidad posible de endospermo.

El material se lleva hasta 5 ml de medio acuoso por adición de agua o solución de sacarosa al 8,5 por ciento y después de hervirse durante 15 minutos en baño de agua, para la destrucción enzimática, se macera con adición de 15,5 ml de la mezcla metanol/cloroformo 2,1:1 v/v, con un 0,02 por ciento del antioxidante butilato de hidroxitolueno.

El homogenizado en atmosfera de nitrogeno se agita esporadicamente y después de una hora se separa la fase liquida por centrifugación.

Los extractos combinados de cloroformo lavados con cloroformo/metanol/NaCl al 0,58 por ciento 3:48:47, se concentran. Disolviendose los lipidos totales secos en cloroformo/metanol 2:1 a volumen constante.

#### Lipidos de reserva

La separación de los lipidos de reserva se efectuó por cromatografia en capa fina de 500  $\mu$ l de lipidos totales.

Como sistema de desarrollo se utilizó hexano/eter/ácido acético 70:30:1 y como reveladores vapores de iodo ó acido sulfúrico.

#### Lipidos constitutivos

Los lipidos polares se separaron por cromatografia en ca-

pa fina desarrollada en dos dimensiones en los sistemas:

I cloroformo/metanol/agua 65:25:4 y II butanol/acido acético/  
agua 60:20:20 en placas previamente lavadas con metanol/clo-  
roformo /acido acético 2:1:1.

Las manchas se detactaron con vapor de iodo ó con reactivos  
especificos de los distintos componentes lipidicos (Dra-  
gendorff, ninhidrina etc).

#### Malas hierbas seleccionadas

"Euphrasia rubra", planta anual, mala hierba de los sem-  
brados, recolectada durante la primavera en Tierra de Campos.

"Odontitis rubra", mala hierba de los prados, recolectada  
durante el otoño en Tierra de Campos.

#### Extracción

En el esquema de extracción de los compuestos de natura-  
leza glucosidica se pretende eliminar material graso y cloro-  
fílico, así como galotaninos.

Material molido de la planta seca . . . . . 10 g

Maceración en metanol/agua al 90 por ciento

durante varios dias a temperatura ambiente. . . . . 100 ml

Filtración y lavado. . . . . 50 ml

Concentración a vacio y trompa

Tratamiento con eter de petroleo (eliminación de material grso clorofilico).

Extracción con cloroformo de la solución hidroalcoholica en las proporciones cloroformo/metanol/agua 10+10:9

Solución acuosa

Solución cloroformica

Tratamiento con acetato de etilo

Solución acuosa

Solución de acetato de etilo

Algunas veces se ha realizado la precipitación con acetato de plomo en presencia de  $\text{CaCO}_3$  para eliminar algunos compuestos fenólicos, y del extracto acuoso concentrado se obtienen los glucosidos (especialmente el más disociado) por tratamiento exhaustivo con acetato de etilo.

Las tres soluciones separadas anteriormente contienen inhibidores de la germinación y del crecimiento, mostrando las pruebas germinativas a distintas concentraciones gran similitud entre los extractos de las dos plantas.

De los extractos cloroformicos se obtuvieron 0,35 g de la planta *Euphrasia rubra* y 0,3 g de la *Odontitis rubra*.

## Métodos

### Esterilización

Los granos de cereales se esterilizan por inmersión durante 20 minutos en solución 0,5 % aproximadamente de hipoclorito sódico ( $\text{NaClO}$ ) recién preparado a partir de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y acidulada con  $\text{ClH}$  a pH 6. Los recipientes de vidrio para la germinación se esterilizan en autoclave.

### Medios nutrientes

El medio nutritivo generalmente utilizado es completo en cuanto a compuestos inorgánicos, tamponado a un pH fisiológico y con un hidrato de carbono asimilable.

En las pruebas de asimilación se utiliza el mismo medio nutriente agarificado y sustituyendo el hidrato de carbono asimilable por la sustancia problema.

Soluciones concentradas:

I - Solución tamponada de fosfatos 66 mM, pH 5,6

II - Solución de macrometales

Se disuelven 10 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 g  $\text{KNO}_3$ , 5 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 2,5 g  $\text{KCl}$  en un litro de agua.

III - Solución ferrica

Se disuelven 5 g  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$  en 100 ml .

de agua.

#### IV - Solución de micrometales

Se disuelven 2 g  $\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g  $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g KI, 0,1  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,1  $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$ , 0,1 g  $\text{Ni SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  en un litro de agua.

#### V - Factores de crecimiento

- a) Se disuelven 20 mg de vitamina  $\text{B}_1$ , 10 mg de vitamina  $\text{B}_2$ , 100 mg de vitamina  $\text{B}_6$ , 10 mg de pantotenato calcico, 1 mg de inositol en 100 ml de agua.
- b) Se disuelven 10 mg de biotina en 100 ml de alcohol isopropilico al 10 por ciento.
- c) Solución de 100 mg de clorhidrato de cisteina en 100 ml de agua.
- d) Se disuelven 100 mg de acido p-aminobenzoico y 10 mg de acido folico en 100 ml de agua.

#### VI - Azucar

## Composición del medio nutriente completo

### Medio inorganico

I . . . 100 ml  
II . . . 10 "  
III . . . 2 "  
IV . . . 1 "

### Medio organico

Va . . . 2,5 ml  
Vb . . . 1,0 "  
Vc . . . 5,0 "  
Vd . . . 2,5 "  
Agar . . . 8,0 g  
Azucar .30,0 g  
H<sub>2</sub>O hasta un litro

### Solución de antibioticos:

Penicilina G Sodica . . . . . 50 mg  
Sulfato de Estreptomicina . . . .100 mg

Se adicionan a los medios esterilizados en la proporción del 10 por ciento.

### Actividad indol-3-acetico-oxidasa

La cantidad de fitohormona que permanece en el medio, se determina colorimetricamente a 535 nm mediante el reactivo de Salkowsky a los doce minutos de reacción. Los valores se expresan en tanto por ciento de AIA destruido, en las tablas, y en los graficos en densidades ópticas D.O frente a tiempo.

La destrucción oxidativa de AIA se verifica en tubos anchos (2,5 cm de diametro) con agitación esporádica a 30 °C de temperatura y en un volumen total de 6 ml de mezcla, generalmente a pH de 5,6 utilizando solución tamponada de fosfatos de 22 mM. Muestras de 1 ml a tiempos de 5, 10, 30, y 60 minutos se vierten sobre el reactivo (8 ml de reactivo Salkowsky + 1 ml de alcohol etílico) agitandolo a continuación.

El reactivo Salkowsky utilizado se preparó con 3 ml de solución de cloruro férrico (40,5 g/ 100 ml de agua destilada), 100 ml de agua destilada y 60 ml de ácido sulfúrico concentrado.



### Actividad peroxidásica

Las peroxidasas catalizan la oxidación por peróxidos de una gran variedad de sustancias muchas de las cuales tienen fuertes bandas de absorción por si mismas o por sus productos de oxidación.

a) Peroxidasa: extracto de raíz purificados en Sephadex

Sustrato : pirogalol

Su determinación se basa en la formación de purpurogalina a partir del pirogalol por el metodo de Willstatter y Stoll con arreglo al esquema siguiente:

1,25 g de pirogalol en 500 ml (20mM)

0,2 ml de agua oxigenada, 12,5 mg en 500 ml (0,74 mM)

500 ml tampón pH 7, 11mM.

Se inicia la reacción con 1 ml de problema y se paraliza agregando 5 ml de ácido sulfúrico 5 N. Se extrae con eter sulfúrico y se enrasa a 25 ml midiendose despues a 430 nm.

Las pruebas se hicieron dividiendo los 500 ml en fracciones de 50 ml y agregando 1 ml de muestra problema a cada uno.

### Actividad amilolitica total

La solución enzimática convenientemente diluida y la solución tamponada de almidón mantenidas a la temperatura del ensayo se mezclan suavemente en partes iguales y se incuban a temperatura constante (25 °C). A intervalos de tiempo de tres, seis y doce minutos se toman muestras de 0,2 ml que rápidamente se vierten en frascos volumetricos de 25 ml y conteniendo 2 ml de reactivo  $I_2/K$ .

La mezcla se enrasa a 25 ml con agua destilada y bien homogenizado se efectua la lectura de su absorbancia a 610 nm frente a blancos correspondientes.

La medida de la actividad  $\alpha$ -amilasa se expresa en D.O ó por el recíproco del tiempo  $(1/t)$  tomado en minutos para un cociente de extinción (Er) igual a 0,5.

Definiendose este cociente como la relación de la D.O<sub>610</sub> en un tiempo T a aquella en el tiempo 0.

### Actividad diastásica

Se expresa por las diferencias entre volúmenes de tiosulfato sodico 0,05 N gastados en la valoración de iodo liberado en el blanco y en las muestras obtenidas con los extractos en

zimaticos.

Este metodo se basa en la oxidación de la materia reductora producida por digestión enzimática del almidón durante una hora a 25 °C con ferricianuro por iodometria.

#### Actividad ATP-asa

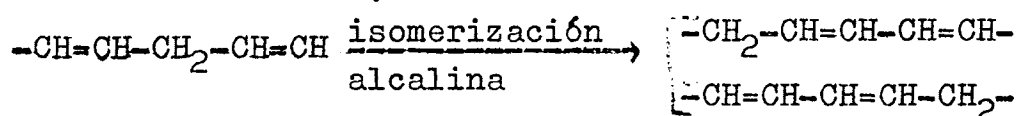
Se expresa como moles de fosforo/ml de extracto.minuto. Los extractos purificados (separación cromatografica en columnas de Sephadex ó dialisis) son incubados a 28°C en presencia de una solución conocida de ATP, iones Mg ó Ca, inhibidores y tampon Tris/ClH 0,1 M a pH 7 (ó el óptimo) hasta un volumen de 2 ml durante un periodo determinado de tiempo.

La reacción se paraliza por adición de ácido perclorico al 12 % y la determinación de fosforo se realiza segun metodo de Fisk y Subbarow de 1 ml de la mezcla de reacción previamente filtrada.

#### Determinación del grado de poliinsaturación en ácidos grasos

Los ácidos grasos insaturados que tienen más de un enlace doble, pueden isomerizarse por tratamiento con KOH a temperatura elevada y transformarse en ácidos grasos en los cuales los dobles enlaces estan conjugados. Puesto que los do-

bles conjugados muestran una absorción característica a 230 nm, los ácidos grasos poliinsaturados pueden determinarse por espectrofotometría, después de su previa isomerización.



Sistema resonante con dobles enlaces conjugados.

Siguiendo el método de Herb-Riemenchneider (23), 1/8 de los lípidos totales obtenidos fueron saponificados con KOH en medio alcohólico a 18°C durante 15 minutos y diluidos a 25 ml con metanol, para su medida espectrofotométrica.

### Proteínas

Apreciación rápida -en extracto acuoso convenientemente diluido- por medida espectrofotométrica a 280 nm.

Valoración según método de Lowry y col. utilizando albúmina de suero como proteína standard y medida de densidad óptica a 750 nm.

### Nitrogeno

La determinación de pequeñas cantidades de nitrógeno se realiza por digestión con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  en matraces Kjeldahl de 50 c.c catalizado con trazas de selenio y agua oxigenada.

La medida directa del amoníaco en las soluciones se reali

za colorimetricamente con el reactivo Nessler bajo control exacto del pH.

### Fosforo

Basados en el procedimiento de Rouser (24) para la determinación cuantitativa de fosforo de las manchas detectadas con iodo - previa eliminación del iodo- se digieren con ácido perclorico al 70 % durante 25 minutos a 250-300 °C.

Enfriado y diluido con agua se desarrolla el color con molibdato en presencia de ácido ascorbico mediante calentamiento en baño de agua a ebullición durante siete minutos exactos. Enfriando rapidamente se centrifuga y mide el supernadante claro a 820 nm.

### Hidratos de carbono

Su determinación se realiza con reactivo Antrona según tecnica de Sunderwirth (25).

### Materia reductora

Se valora como glucosa mediante adaptación fotométrica del método de Somogy-Nelson.

II.-- CRECIMIENTO DE EMBRIONES

MICROMALTEADO. RESPIRACION

## Crecimiento de embriones

El crecimiento se llevo a cabo en tubos, con granos de cebada desprovistos de envolturas externas, cortados transversalmente y con la menor parte posible de endospermo.

Los tubos que contenian 5 ml de medio nutritivo completo agarificado y donde el azucar era sacarosa, se esterilizaron en autoclave.

Los reguladores del crecimiento, disueltos en soluciones de urea y esterilizados con alcohol isopropilico se adicionaron a los tubos precalentados ( 60-70 °C ) para obtener una solución final homogenea.

Concentraciones finales:

Control . . . . . urea  $10^{-4}$  M

AIA .. . . . urea  $10^{-4}$  M + AIA  $10^{-5}$  M

GA<sub>3</sub> . . . . . urea  $10^{-4}$  M + + GA<sub>3</sub>  $10^{-5}$  M

AIA/GA<sub>3</sub> . . . . . urea  $10^{-4}$  M + AIA  $10^{-5}$  M + GA<sub>3</sub>  $10^{-5}$  M

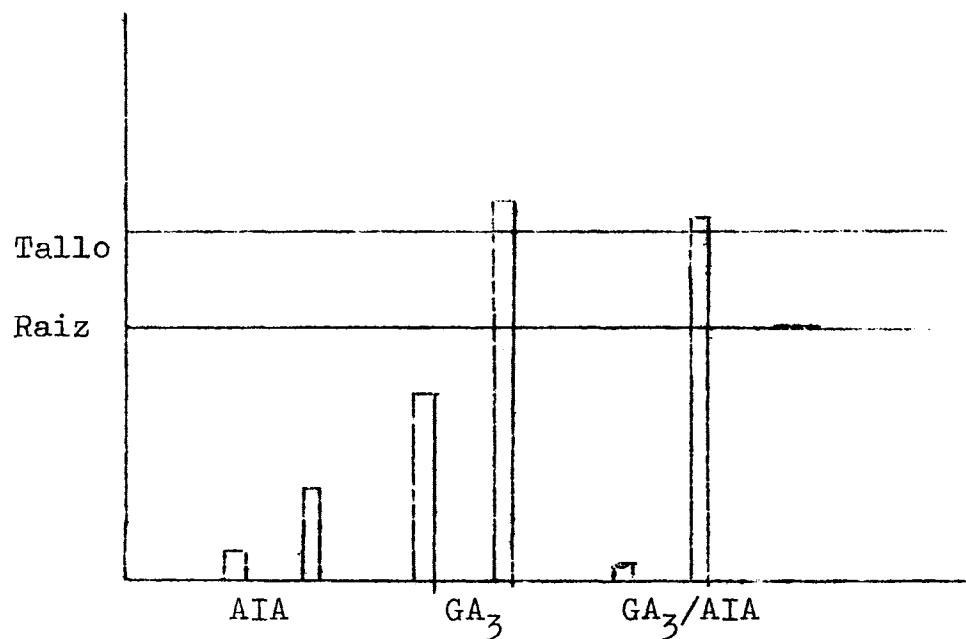
Isopropanol . . . . 0,02 por ciento

La solución férrica se adiciona independientemente en el momento de la preparación del medio.

La solución de biotina se adiciona en su parte proporcional a cada tubo

Crecimiento de embriones despues de setenta y dos horas de germinación.

	Control	AIA	GA <sub>3</sub>	AIA/GA <sub>3</sub>
Raiz cm	9,2	0,9	6,8	0,9
Tallo cm	11,7	3,5	13,0	12,5



El ácido giberelico, como regulador del crecimiento a concentraciones de  $5 \cdot 10^{-6}$  M, contrarresta la acción inhibidora de la misma concentración del ácido indol-3-acético en el tallo de la plantula pero no en la raiz, poniendo de manifiesto que ambos organos muestran distinta sensibilidad hacia la fitohormona.





Ensayos:

N/N ..... Medio normal renovado  
N/Br ..... Medio normal sustituido por Bromato  
N/C ..... Medio normal sustituido por Cumarina  
N/F ..... Medio normal sustituido por Formaldehído  
G/G ..... Medio activante renovado  
G/Br ..... Medio activante sustituido por Bromato  
G/C ..... Medio activante sustituido por Cumarina  
G/F ..... Medio activante sustituido por Formaldehído

Analisis:

55 granos germinados ..... Actividad amilolitica total  
5 " " ..... Materia reductora  
3 " " ..... Nitrogeno total  
12 " " ..... Nitrogeno soluble  
25 " " ..... Lipidos

Lipidos: Equivalente de ácido palmitico en mgs de 25 granos.

Extracción con cloroformo/metanol 2:1 en caliente. Eva  
poración a vacío y redisolución en eter de petroleo.

Actividad amilolitica total: Cinco granos macerados en NaCl al  
0,5 por ciento y enrasados a 10 ml. Centrifugación y  
dilución del extracto (1 ml ext./4 ml de H<sub>2</sub>O).

	Actividad amilolitica total			Mat. redc. Eqv. Gluc. mg/gn	Nitrogeno total-sol g/gn	Lipidos Eqv. pal mg/25gn	Raiz - cm
N/N	.31	.26	.16	1,8-2,0	495 - 238	20,5	1,5-2,0
N/Br	.31	.29	.26	1,0-1,2	487 - 195	15,5	0,5-0,7
N/C	.32	.30	.24	1,1-1,3	553 - 216	14,5	0,7
N/F	.31	.35	.16	1,2-1,5	528 - 206	18,5	0,5
G/G	.30	.22	.07	2,4-3,2	575 - 319	20,5	1,5-2,0
G/Br	.31	.27	.15	1,3-1,7	491 - 225	20,5	1,0
G/C	.33	.29	.21	1,2-1,6	537 - 302	19,5	1,2
G/F	.30	.22	.07	1,6-1,7	570 - 316	18,0	0,7

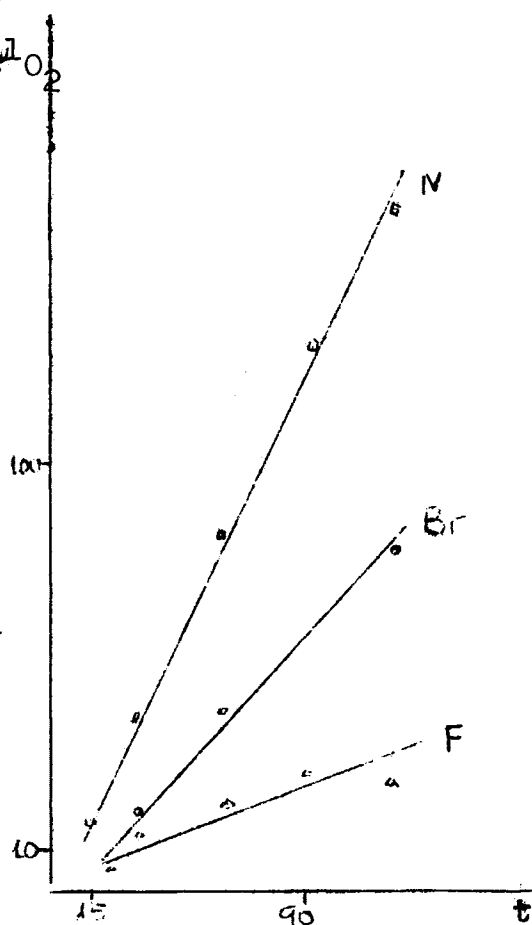
La utilización en malteria del ácido giberelico, requiere un cuidadoso control y conjugación con sistemas inhibidores ó frenantes. Procurando disminuir la actividad proteolitica o conjunto de proteínas solubles y reducir el desarrollo vigoroso.

El control del desarrollo, realizado por Kropff con atmosfera de mayor contenido en CO<sub>2</sub> y por Pollock (7) por inmersión en agua se puede llevar a cabo facilmente con inhibidores de la división celular como bromato potasico.

## Respiración

Ensayos relativos a 5 granos germinados, 1 ml de  $H_2O$  y 0,2 ml de KOH 2 N en aparatos respirometros Warburg a 30 °C.

medio germc	N/N	N/Br	N/F
Tiempo minutos	$\mu l$ $O_2$	$\mu l$ $O_2$	$\mu l$ $O_2$
5	7,5	2,0	4,0
10	11,5	3,0	5,0
15	17,0	7,0	7,0
30	40,0	19,0	14,0
60	83,0	42,0	20,0
90	127,0	63,0	28,0
120	161,0	78,0	26,0



El ácido giberelico activa marcadamente la respiración de los granos de cebada durante la germinación y el bromato y formaldehído la inhiben fuertemente.

La germinación se llevo a cabo en cajas/petri de nueve cms de diametro, durante veinticuatro y cuarenta y ocho horas en cebada, a temperatura ambiente y en presencia de 4 ml de solución tamponada de fosfatos  $2,2 \cdot 10^{-6}$  M ó  $GA_3$   $5 \cdot 10^{-5}$  M.

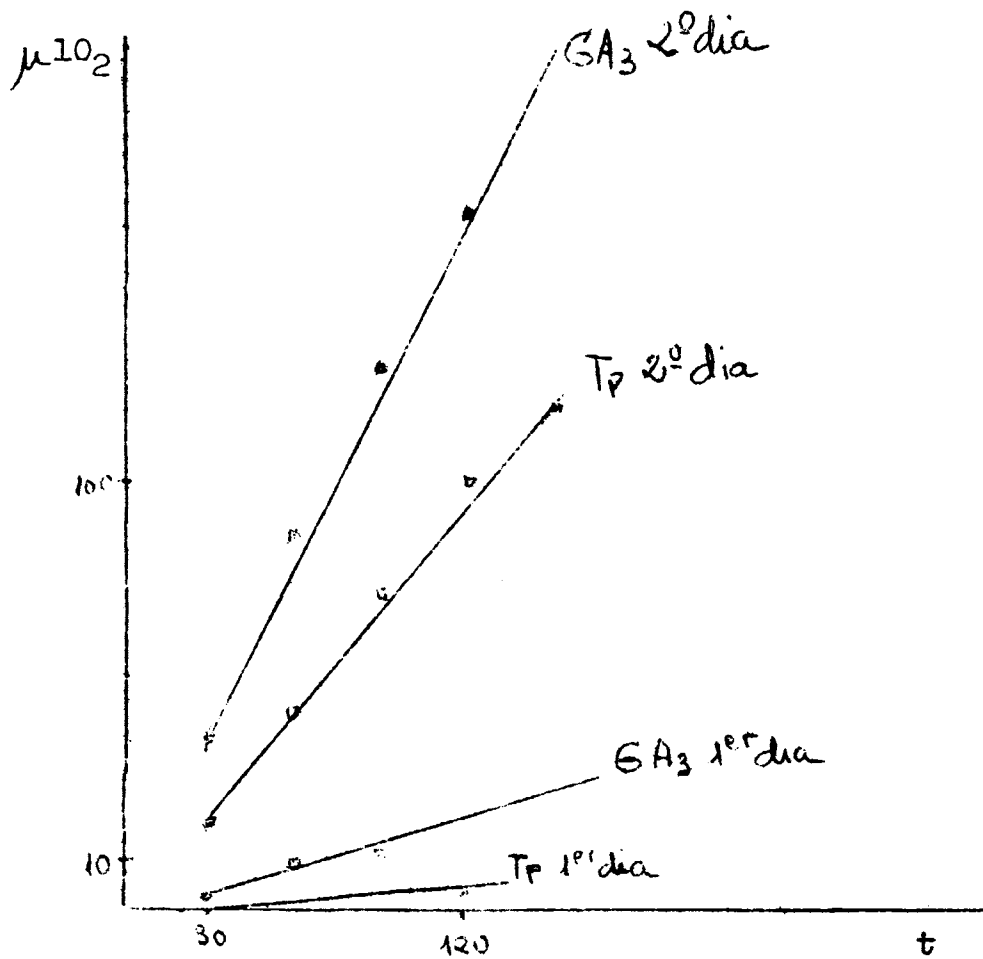
Los ensayos se realizaron en aparatos respirometros Warburg, con 5 granos representativos, 1 ml de agua destilada y 0,2 ml de KOH 2 N.

#### Primer dia de germinación

Medio de germinación	Tampon	$GA_3$
Tiempo en minutos	1 O <sub>2</sub>	1 O <sub>2</sub>
30	0	2,3
60	1,2	10,0
90	3,1	13,0
120	3,1	17,7

#### Segundo dia de germinación

5	0,6	6,0
10	3,7	10,0
15	8,8	15,0
30	19,0	40,0
60	46,0	88,5
90	74,0	127,0
120	100,0	163,0



### Comportamiento de semillas sin envolturas externas

La germinación se realizó con granos completos de centeno y trigo en dos ml de  $H_2O$  y 0,5 ml de antibiotico durante veinticuatro y cuarenta y ocho horas.

La prueba respiratoria corresponde a 10 granos completos con 1 ml de agua esterilizada.

#### Centeno

Tiempo	24 horas de germinación			48 horas de germinación		
	$\mu l O_2$	$\mu l CO_2$	$CO_2/O_2$	$\mu l O_2$	$\mu l CO_2$	$CO_2/O_2$
15	21,5	16,4	1,31	31,4	29,2	1,07
30	19,0	17,8	1,07	28,7	30,5	0,94
60	39,4	34,6	1,13	51,9	55,8	0,93
90	37,4	35,5	1,05	53,0	60,8	0,81
120	34,0	36,5	0,93	-	-	-

#### Trigo

Tiempo	24 horas de germinación			48 horas de germinación		
	$\mu l O_2$	$\mu l CO_2$	$CO_2/O_2$	$\mu l O_2$	$\mu l CO_2$	$CO_2/O_2$
15	45,0	41,5	1,08	39,0	37,0	1,05
30	35,8	38,0	0,93	35,0	40,0	0,87
60	73,0	76,0	0,96	74,0	72,0	1,02

Estos cereales no muestran impedimento a la difusión de los gases por carecer de envolturas externas.

Efecto frenante del inhibidor cumarina en la respiración de plántulas

La prueba respiratoria corresponde a 10 granos de cebada que germinaron en cuatro ml de agua durante dos días.

esquema experimental						
	I		II		III	
Tampón 22 mM pH 5,6	1	1	-	-	-	-
Cumarina $5 \cdot 10^{-4}$ pH 5,6	-	-	1	1	-	-
Cumaina $5 \cdot 10^{-6}$ pH 5,6	-	-	-	-	1	1
KOH 2N	-	0,2	-	0,2	-	0,2

Tiempo - Minutos	I			II			III		
	$\mu$ l O <sub>2</sub>	$\mu$ l CO <sub>2</sub>	$\frac{CO_2}{O_2}$	$\mu$ l O <sub>2</sub>	$\mu$ l CO <sub>2</sub>	$\frac{CO_2}{O_2}$	$\mu$ l O <sub>2</sub>	$\mu$ l CO <sub>2</sub>	$\frac{CO_2}{O_2}$
5	7,1	7,2	0,98	9,3	7,3	1,26	12,7	11,2	1,14
10	14,3	14,5	0,98	19,2	15,8	1,20	22,8	17,4	1,31
30	48,6	50,3	0,96	62,3	56,7	1,10	62,3	62,6	0,99
60	99,9	101	0,98	115	103	1,11	121	115	1,04

La cumarina que inhibe el crecimiento, muestra en las condiciones experimentales algun aumento en la respiración de las plántulas.



Acción de diversos compuestos en la respiración de troceados  
de raíces de cebada,

esquema experimental			
	I	II	III
Raiz	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Antibiotico	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
KOH 2N	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
H <sub>2</sub> O	2,0 ml	-	-
Tampon pH 6,8	-	2,0 ml	1,4 ml
Sacarosa	-	-	0,5 ml
Cl <sub>2</sub> Mg 0,5 M	-	-	0,1 ml

Tiempo	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l O}_2$
15	8,0	14,0	13,6
30	11,2	11,7	12,6
60	19,9	21,0	22,6
90	18,0	17,6	22,6
120	17,0	17,6	21,5
150	18,2	18,7	22,6
180	17,0	18,2	23,0
210	13,4	14,0	21,5

Raiz troceada de cebada de tres días de germinación

esquema experimental						
Raiz gramos	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampon pH 6,8	1,6	1,6	-	-	-	-
Iodo Act. $10^{-4}$	-	-	1,6	1,6	-	-
Iodo Act. $10^{-3}$	-	-	-	-	1,6	1,6
KOH 2N	-	0,2	-	0,2	-	0,2

Tiempo - minutos	1 O <sub>2</sub>	1 CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 O <sub>2</sub>	1 CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 O <sub>2</sub>	1 CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
15	16,0	23,0	0,7	15,6	18,4	0,85	17,1	17,2	0,99
30	6,6	15,8	0,42	7,4	14,8	0,50	8,1	10,0	0,73
60	17,2	26,5	0,65	16,8	24,8	0,67	13,4	14,1	0,94
90	12,1	21,8	0,55	12,7	20,0	0,64	10,6	10,6	1,00
120	16,1	20,5	0,79	10,0	16,5	0,61	7,9	7,2	1,09
150	13,4	18,2	0,74	14,5	16,2	0,96	6,6	5,9	1,12
180	12,0	19,4	0,61	11,8	16,0	0,73	5,4	6,5	0,83

La elevada respiración endógena y los cocientes respiratorios bajos parecen indicar la probable incorporación del CO<sub>2</sub> de nuevo al metabolismo y la utilización del O<sub>2</sub> por oxidasas y peroxidasas

Raiz troceada de cebada de tres dias de germinación.

esquema experimental						
	I		II		III	
Raiz gramos	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antibiotico	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampon pH 6,8	1,6	1,6	-	-	-	-
Dicumarol $5 \cdot 10^{-4}$	-	-	1,6	1,6	-	-
Dicumarol $5 \cdot 10^{-5}$	-	-	-	-	1,6	1,6
KOH 2N	-	0,2	-	0,2	-	0,2

Tiempo minutos	$\mu l$ $O_2$	$\mu l$ $CO_2$	$CO_2$ $O_2$	$\mu l$ $O_2$	$\mu l$ $CO_2$	$CO_2$ $O_2$	$\mu l$ $O_2$	$\mu l$ $CO_2$	$CO_2$ $O_2$
15	20,6	24,3	1,17	17,8	21,3	1,2	15,4	14,6	0,94
30	20,6	16,6	0,8	16,8	18,4	1,12	14,8	11,2	0,76
60	34,5	28,8	0,84	25,5	26,0	1,02	39,0	37,5	0,96
90	29,0	26,7	0,92	20,5	21,5	1,02	23,0	18,8	0,82
120	32,5	26,6	0,82	20,0	19,0	0,94	24,2	17,8	0,74
150	25,5	26,6	1,04	14,8	14,4	0,97	21,3	17,3	0,81
180	-	-	-	14,2	15,0	1,06	31,5	29,3	0,93

El iodoacetato sódico presenta un efecto inhibidor a concentraciones de  $10^{-3}M$ , siendo más debiles los efectos del dicumarol.

## Acción desacoplante del Dinitrofenol

Germinación de embriones de cebada en tres ml de H<sub>2</sub>O

esquema experimental						
	I		II		III	
Medios granos	5	5	5	5	5	5
Tampon pH 5,6	1	1	-	-	-	-
D.N.F. $5 \cdot 10^{-4}$	-	-	1	1	-	-
D.N.F. $5 \cdot 10^{-6}$	-	-	-	-	1	1
KOH 2N	-	0,2	-	0,2	-	0,2

Tiempo - minutos	I			II			III		
	$\mu$ l O <sub>2</sub>	$\mu$ l CO <sub>2</sub>	$\frac{CO_2}{O_2}$	$\mu$ l O <sub>2</sub>	$\mu$ l CO <sub>2</sub>	$\frac{CO_2}{O_2}$	$\mu$ l O <sub>2</sub>	$\mu$ l CO <sub>2</sub>	$\frac{CO_2}{O_2}$
5	33,8	23,9	1,4	34,2	9,3	3,6	5,4	6,4	0,84
10	43,5	33,2	1,4	34,0	17,3	1,96	16,2	19,2	0,84
15	56,5	45,2	1,24	22,6	18,6	1,21	27,1	28,2	0,96
30	84,5	78,5	1,07	70,8	51,9	1,36	64,1	69,1	0,94
60	152	146	1,04	138	118	1,16	161	161	1,00

Bajo su condición de desacoplante el D.N.F. manifiesta inhibición a  $5 \cdot 10^{-4}$  M y activación a  $5 \cdot 10^{-6}$ .

III.- MODIFICACIONES GENERALES DURANTE  
LA GERMINACION

## Modificaciones generales durante la germinación

Separación en columnas de Sephadex.

En extractos totales, proteicos y no proteicos de cebada, purificados en Sephadex G-50, se determinaron los cambios generales en hidratos de carbono, proteínas y fenoles ocurridos durante la germinación.

Extracto total	: Maceración de 36 granos en 30 ml de
E.T:	NaCl 0,1 M.
Fracción proteica	: Dialisis del extracto total frente a
F.P.	NaCl 0,1 M durante 18 horas
Fracción no proteica	: Precipitación en frío de las proteínas
F.N.P.	con ácido tricloroacético al 10 por
	ciento.

La elución de las columnas se efectuó con NaCl 0,1 M y las fracciones recogidas fueron de aproximadamente 10 ml.

Cebada sin germinar

E.T. : 5 ml del extracto conteniendo 0,90 mg de nitrogeno.  
 F.N.P. : 10 ml del extracto conteniendo 0,49 mg de nitrogeno.  
 F.P. : 5 ml del extracto dializado.

Eluido	E.T.		F.N.P.			F.P.	
	Pr	Fen	Pr	H.C	Fen	Pr	Fen
10	.021	.000	.005	.050	.000	.024	.000
20	.014	.000	.012	.050	.000	.017	.000
30	.012	.045	.005	.050	.017	.025	.000
40	.067	.105	.004	.050	.005	.033	.000
50	.117	.120	.040	.180	.005	.160	.087
60	.094	.100	.011	.105	.050	.107	.110
70	.093	.170	.005	.050	.005	.075	.055
80	.100	.190	.007	.040	.000	.035	.025
90	.104	.140	.004	.045	.000	.045	.075
100	.140	.140	.000	.040	.000	.130	.340
110	.255	.230	.068	.040	.000	.105	.160
120	.400	.320	.014	.070	.015	.070	.105
130	.540	.300	.057	.780	.050	.060	.090
140	.610	.110	.165	1.500	.095	.053	.065
150	.300	.090	.205	.620	.170	.045	.027
160	.112	.070	.184	.050	.195	.035	.010
170	.123	.030	.093	.030	.210	.025	.000
180	.085	.040	.040	.040	.140	.020	.000
190	.043	.010	.020	.060	.065	.020	.000

Cebada primer dia de germinación

E.T. : 5 ml del extracto conteniendo 1,06 mg de nitrogeno.  
 F.N.P.: 10 ml del extracto conteniendo 0,86 mg de nitrogeno  
 F.P. : 5 ml del extracto dializado.

Eluido	E.T.		F.N.P.			F.P.	
	Pr	Fen	Pr	H.C.	Fen	Pr	Fen
10	.022	.000	.055	.030	.000	.038	.000
20	.024	.000	.068	.030	.000	.039	.000
30	.031	.000	.063	.030	.000	.057	.000
40	.147	.040	.082	.040	.000	.065	.010
50	.212	.117	.094	.177	.020	.375	.200
60	.085	.055	.060	.200	.040	.110	.087
70	.100	.050	.061	.115	.000	.063	.050
80	.123	.125	.069	.070	.000	.075	.065
90	.161	.200	.075	.035	.000	.200	.265
100	.200	.245	.103	.060	.030	.300	.230
110	.385	.280	.090	.560	.065	.275	.100
120	.650	.240	.166	1.980	.070	.300	.080
130	.900	.345	.310	1.500	.150	.095	.030
140	.880	.350	.295	.480	.275	.045	.010
150	.340	.120	.170	.045	.320	.050	.000
160	.102	.075	.098	.030	.200	.027	.000
170	.088	.050	.080	.020	.095	.026	.000
180	.078	.035	.045	.025	.065	.043	.000
190	.045	.020	.030	.015	.030	.022	.000



Cebada segundo día de germinación

E.T. : 5 ml de extracto total.

F.N.P.: 10 ml de extracto sin proteínas

F.P. : 5 ml de extracto dializado.

Eluido	E.T.		F.N.P.			F.P.	
ml	Pr	Fen	Pr	H.C.	Fen	Pr	Fen
10	.000	.000	.000	.020	.000	.013	.015
20	.000	.005	.000	.025	.010	.005	.015
30	.007	.005	.000	.020	.000	.000	.015
40	.105	.075	.000	.040	.010	.010	.015
50	.145	.160	.010	.102	.060	.225	.230
60	.010	.060	.000	.050	.025	.057	.140
70	.035	.100	.004	.045	.020	.068	.090
80	.045	.200	.000	.067	.015	.105	.280
90	.125	.185	.000	.090	.055	.080	.230
100	.206	.335	.000	.168	.080	.060	.140
110	.203	.250	.015	.270	.060	.092	.115
120	.370	.320	.030	.710	.100	.275	.175
130	.800	.640	.093	2.000	.180	.300	.125
140	.440	.860	.350	2.000	.410	.043	.055
150	.420	.820	.450	1.400	.780	.000	.030
160	.295	.250	.325	.617	.690	.011	.020
170	.150	.140	.317	.280	.570	.003	.017
180	.123	.110	.190	.060	.330	.000	.010
190	.060	.080	.055	.035	.135	.000	.000

D.O

— Natural  
- - - 1<sup>er</sup> dia ger.  
- . - 2<sup>o</sup> dia ger.

F.P.

F.N.P.

E.T.

3

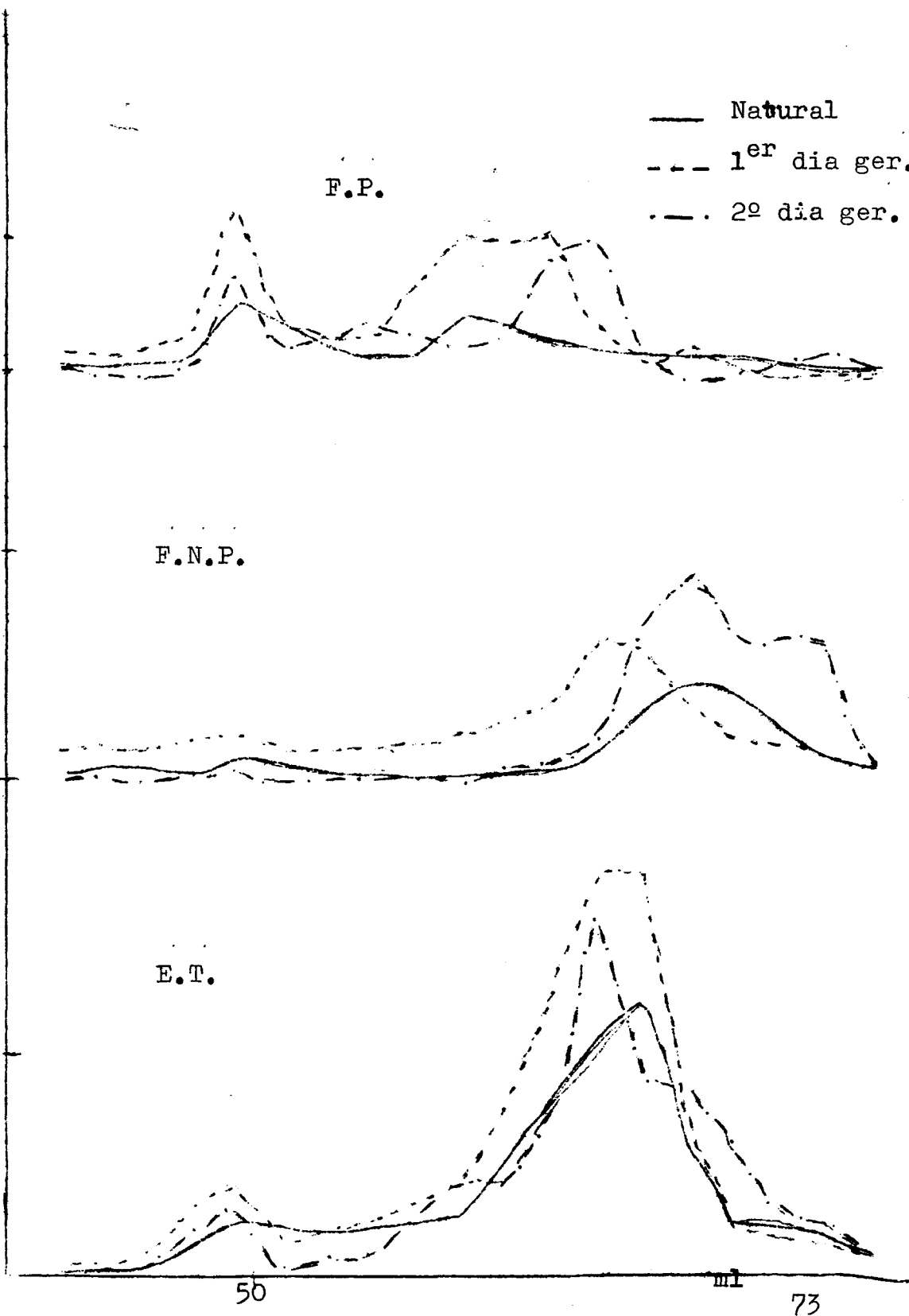
5

5

50

ml

73



D.O

— Natural

- - - 1<sup>er</sup> dia ger.

. . . 2<sup>o</sup> dia ger.

Fenoles

.4

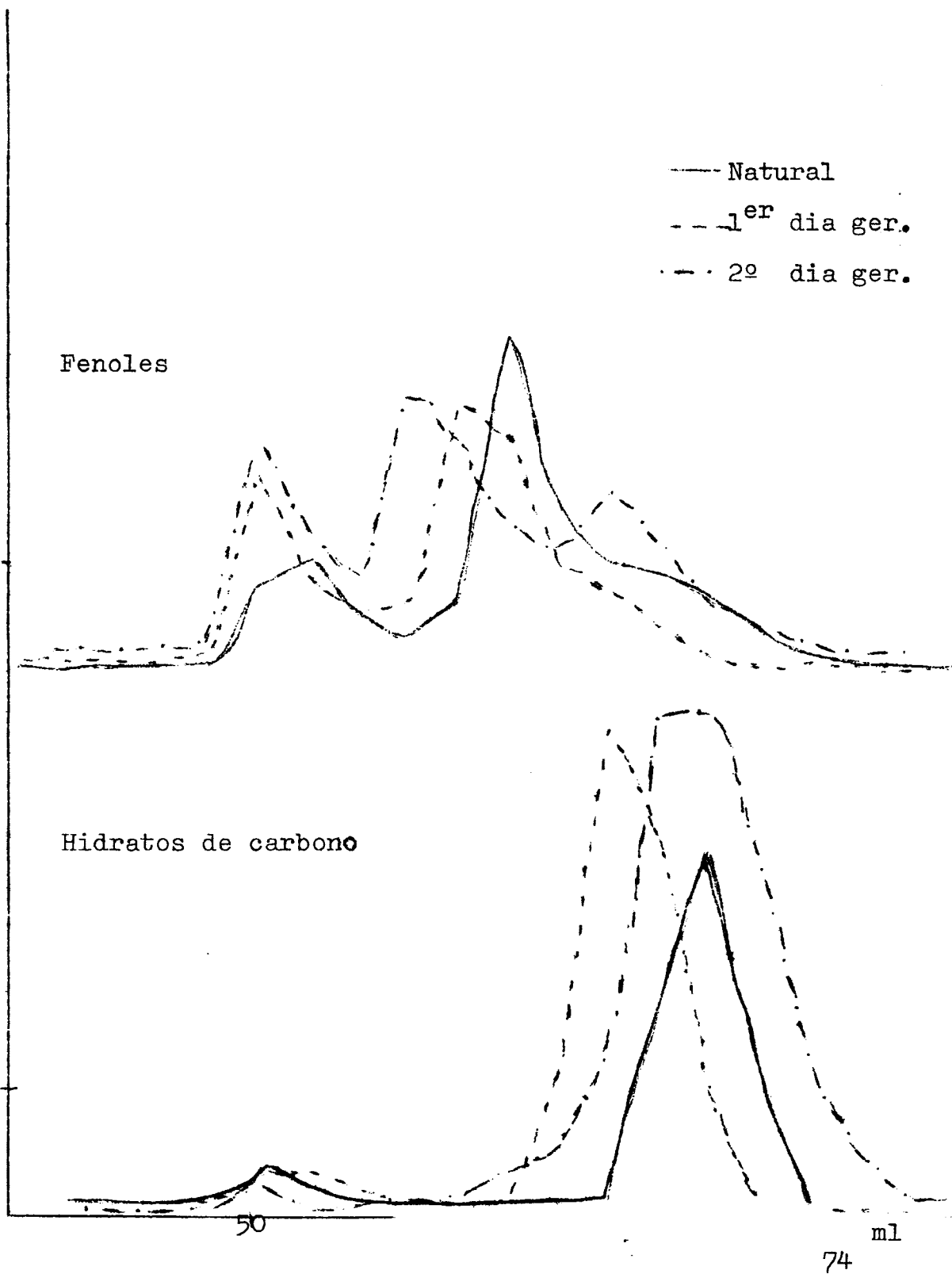
Hidratos de carbono

.5

50

ml

74



### Actividad de las amilasas durante la germinación

Cebada germinando durante tres días a 20°C , con 4 ml de medio.

<u>Medios</u>	<u>Conc. final de reguladores</u>	<u>Long. raíz cm.</u>
---------------	-----------------------------------	-----------------------

Control	Tampon fosfato 22mM pH 6,8	0,4-0,9
---------	----------------------------	---------

GA <sub>3</sub>	Acido giberelico 5.10 <sup>-5</sup> M	1,1-2,2
-----------------	---------------------------------------	---------

El extracto se obtuvo por maceración de 25 granos en agua. Mantenido a 25 °C una hora y diluido a 100 ml. Decantando el supernadante se constituye así el "extracto acuoso".

### Actividad amilolitica total

Mezcla de reacción: 2 ml del extracto acuoso más 2 ml de solución tamponada de almidón.

Medios	Control				GA <sub>3</sub>		
Dias germinación	0	1	2	3	1	2	3
Tiempo minutos	D.O.						
3	.55	.58	.56	.48	.56	.52	.45
6	.50	.50	.47	.38	.49	.43	.34
9	.43	.49	.41	.28	.46	.34	.20
15	.35	.39	.27	.09	.35	.19	.05
30	.19	.20	.14	-	.19	.09	-

### Actividad diastásica

Medios	Control				GA <sub>3</sub>		
Días germinación	0	1	2	3	1	2	3
meq/tiosulf/ml extr.	0,84	1,24	1,48	1,72	1,08	1,64	2,08

El efecto del ácido giberélico se hace notorio a partir del segundo día de germinación y va acompañado de un aumento de la actividad sacarificante, debida a las acciones complementarias de  $\beta$ -amilasa y límite dextrinasa.

### Efecto del tiempo de preincubación

Mezcla de reacción: 1 ml de extracto acuoso más 1 ml de tampon y dos ml de almidón tamponado.

Incubación	15 minutos			1 hora			2 horas		
pHs	4	4,6	5,2	4	4,6	5,2	4	4,6	5,2
Tiempo minutos	D.O.								
10	.41	.35	.35	.44	.35	.36	.46	.39	.38
15	.36	.26	.20	.38	.33	.28	.39	.29	.28
30	.14	.03	.03	.24	.10	.10	.25	.07	.05
60	-	-	-	.13	-	-	.14	-	-
1/t	0,04	0,06	0,07	0,04	0,05	0,06	0,04	0,05	0,06

### Efecto de pH

Actividad amilolitica total.

Mezcal de reacción: 1 ml de extracto, más 1 ml de tampon y 2 ml de almidón tamponado.

Preincubación	Dos horas								
Dias de germ.	0			2			3		
pHs	4	4,6	5,2	4	4,6	5,2	4	4,6	5,2
Tiempo minutos	D.O.								
10	.58	.56	.58	.50	.47	.49	.52	.44	.44
15	.54	.51	.55	.42	.40	.41	.48	.32	.31
30	.45	.36	.37	.33	.24	.21	.33	.08	.07
60	.24	.20	.31	.17	.11	.11	.17	-	-
1/t	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04	0,05	0,03	0,06	0,06

### Acción de los extractos de avena sin germinar

a) Actividades diastásicas.-

Maceración de 50 granos de cebada natural ó germinada durante tres dias y avena natural en 25 ml de ClK 0,15 M. Mantendidos 1 hora a 25 °C se centrifugan y los supernadantes constituyen los extractos concentrados.

	<u>Cb natural</u>	<u>Av natural</u>	<u>Cb germinada</u>
meq. tiosulf/ml	8,0	0,7	17,0

b) Actividades de las mezclas de extractos enzimáticos.-

Se realizaron ensayos comparativos con extractos concentrados de cebada germinada naturales (diluidos diez veces) ó ca-entados a 70 °C ( $\alpha$ -amilasa) en presencia de calcio.

esquema experimental					
Ensayos	I	II	III	IV	V
Cebada 70°C	-	-	1	1	-
Cebada dil.	-	1	-	-	-
NaCl <sub>2</sub> 0,2M	1	1	1	1	-
Avena nat.	-	0,5	-	0,5	0,5
H <sub>2</sub> O	0,5	-	0,5	-	2,0

Actividades amiloliticas.-

Ensayos	I	II	III	IV	V
Tiempo min.	D.O.				
15	.81	.75	.50	.47	.88
30	.70	.66	.15	.14	.85
60	.46	.39	.01	-	.80
120	.12	.07	-	-	.76

Actividades diastasicas.-

Tiempo min.	meq. de tiosulf/2,5 ml				
120	5,1	6,0	3,8	4,6	1,1

### Lípidos polares y de reserva

En la separación de los lípidos de reserva de los polares se aprecia que los triglicéridos acumulados en el endospermo disminuyen durante el primer día de germinación.

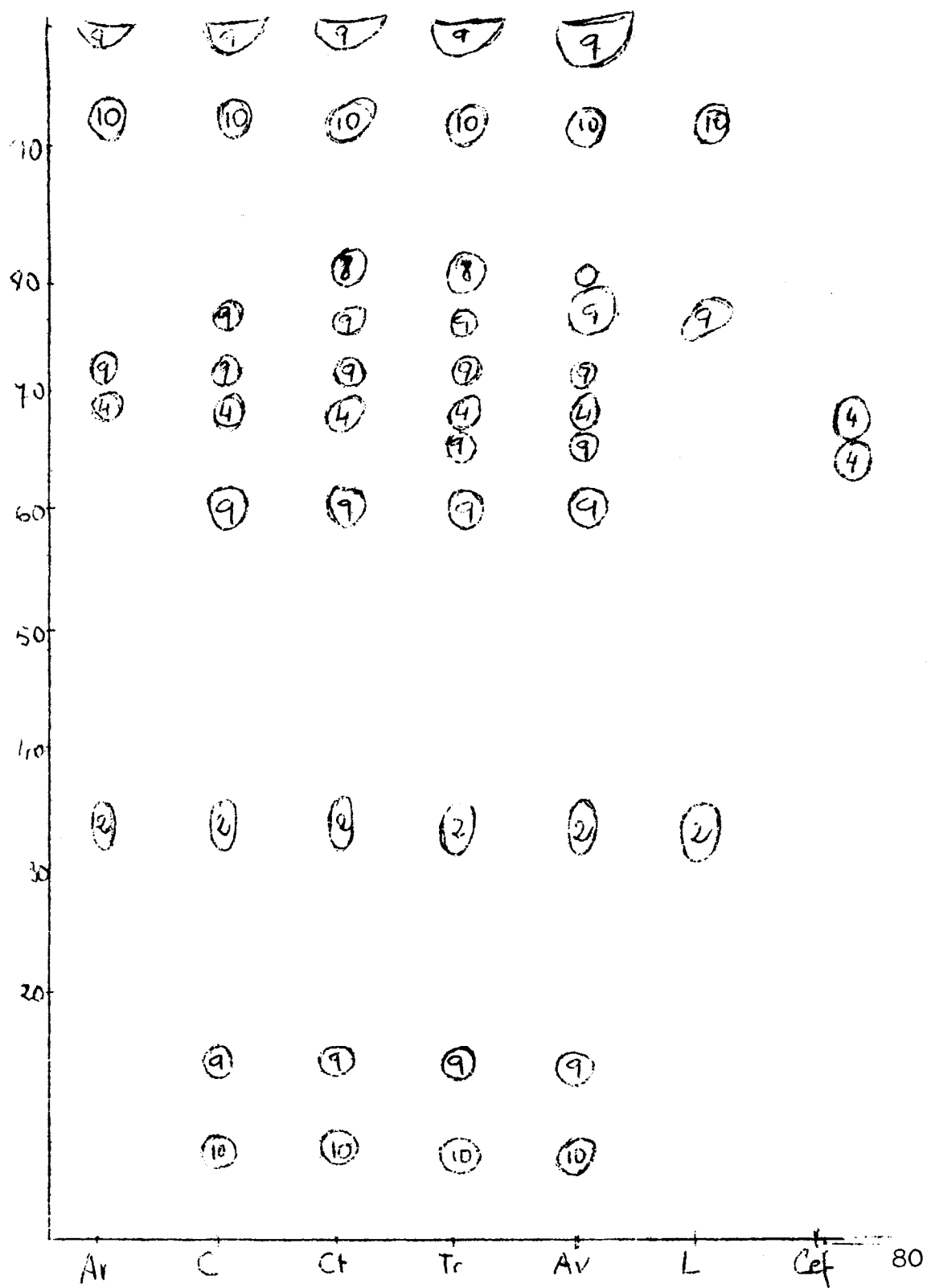
En los lípidos polares, separados por cromatografía bidimensional en capa fina, se detectan cuatro zonas típicas, de las cuales la lisofosfatidilcolina y fosfatidilcolina presentan mayor pureza.

### Lípidos totales en granos de cereales

Lípidos totales de arroz, cebada, centeno, trigo y avena se desarrollaron comparativamente en placas activadas a 110°C durante 30 minutos en el sistema cloroformo/metanol/agua 65:25:4, detectándose las manchas por pulverización con ácido sulfúrico en etanol.

Ar.- Arroz	C.- Cebada	Ct.- Centeno
Tr.- Trigo	Av.- Avena	L.- Lecitina
Cef.-Cefalina		

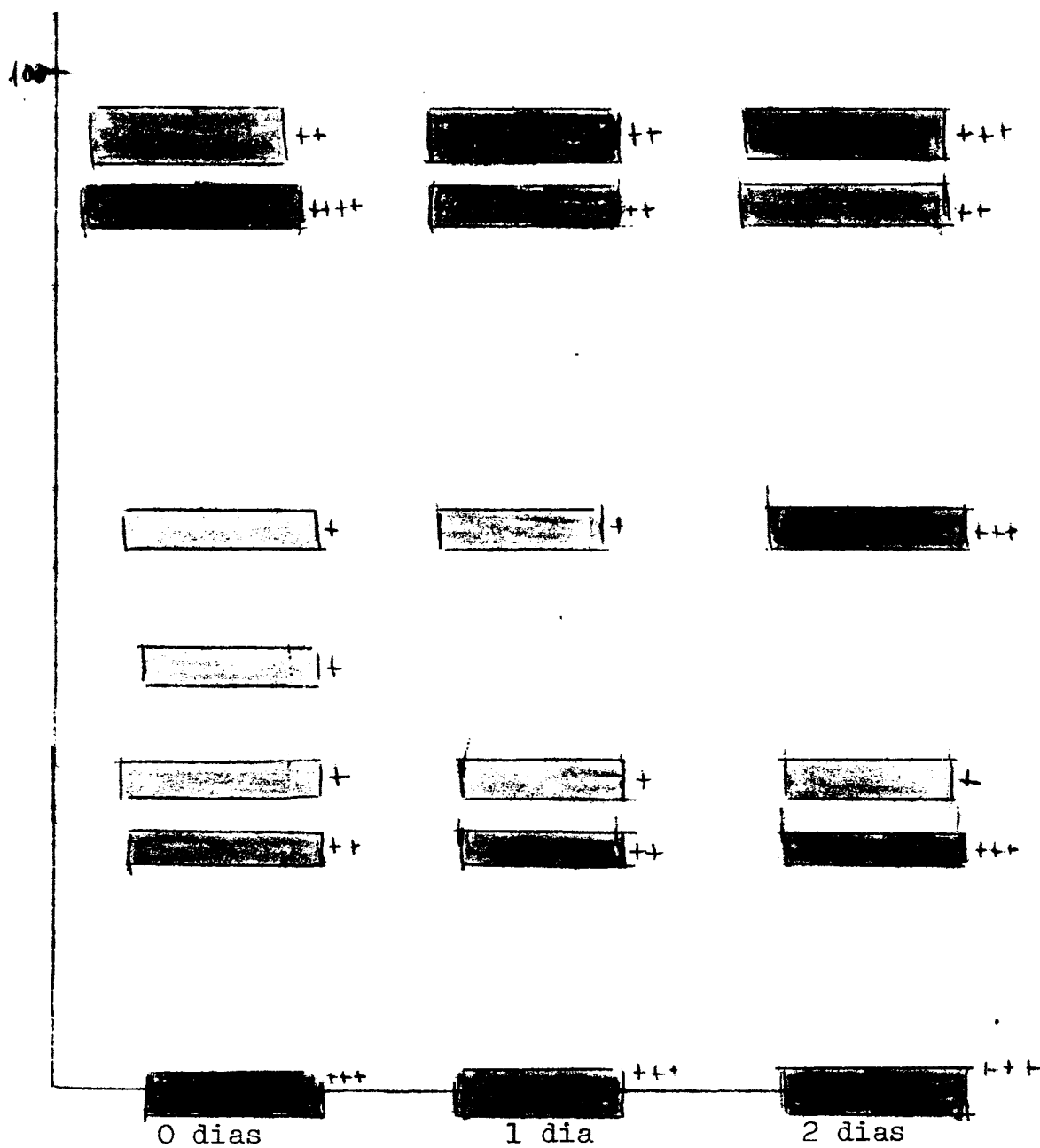




Lípidos de reserva

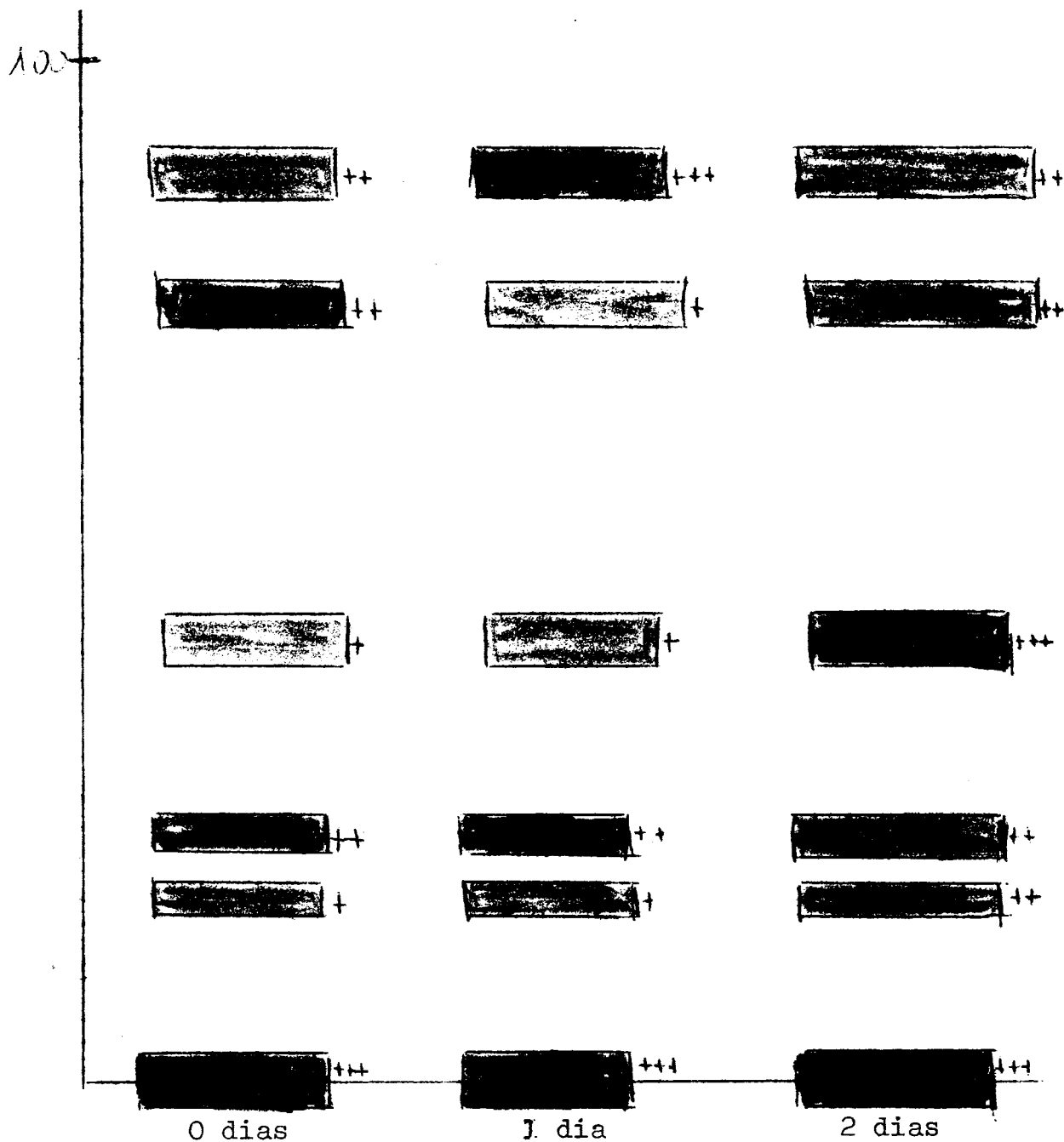
Embriones de avena .

Hexano/Eter/Ac. Acético 70:30:1



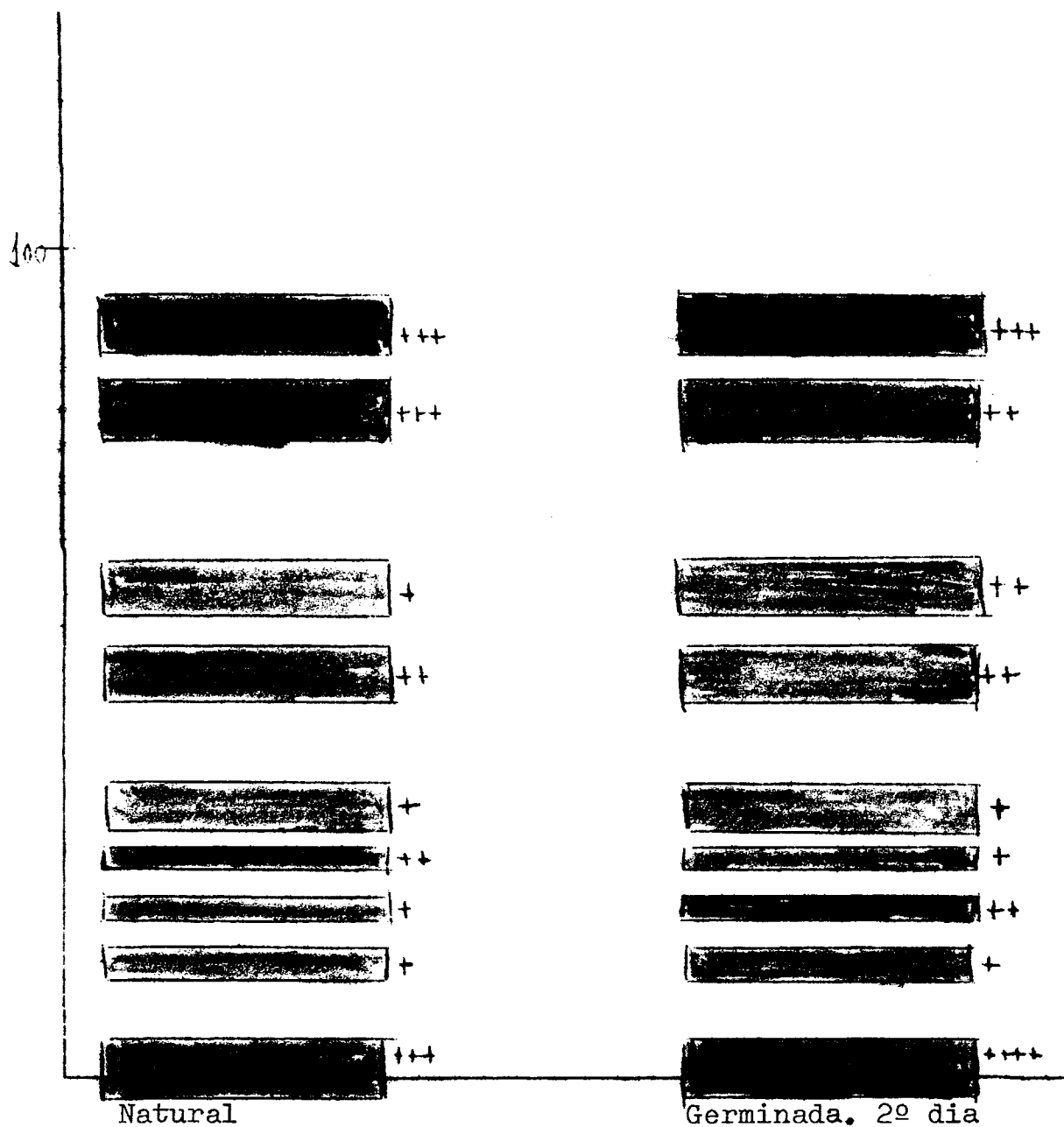
Endospermos de avena.

Hexano/Eter/Ac.Acetico 70:30:1



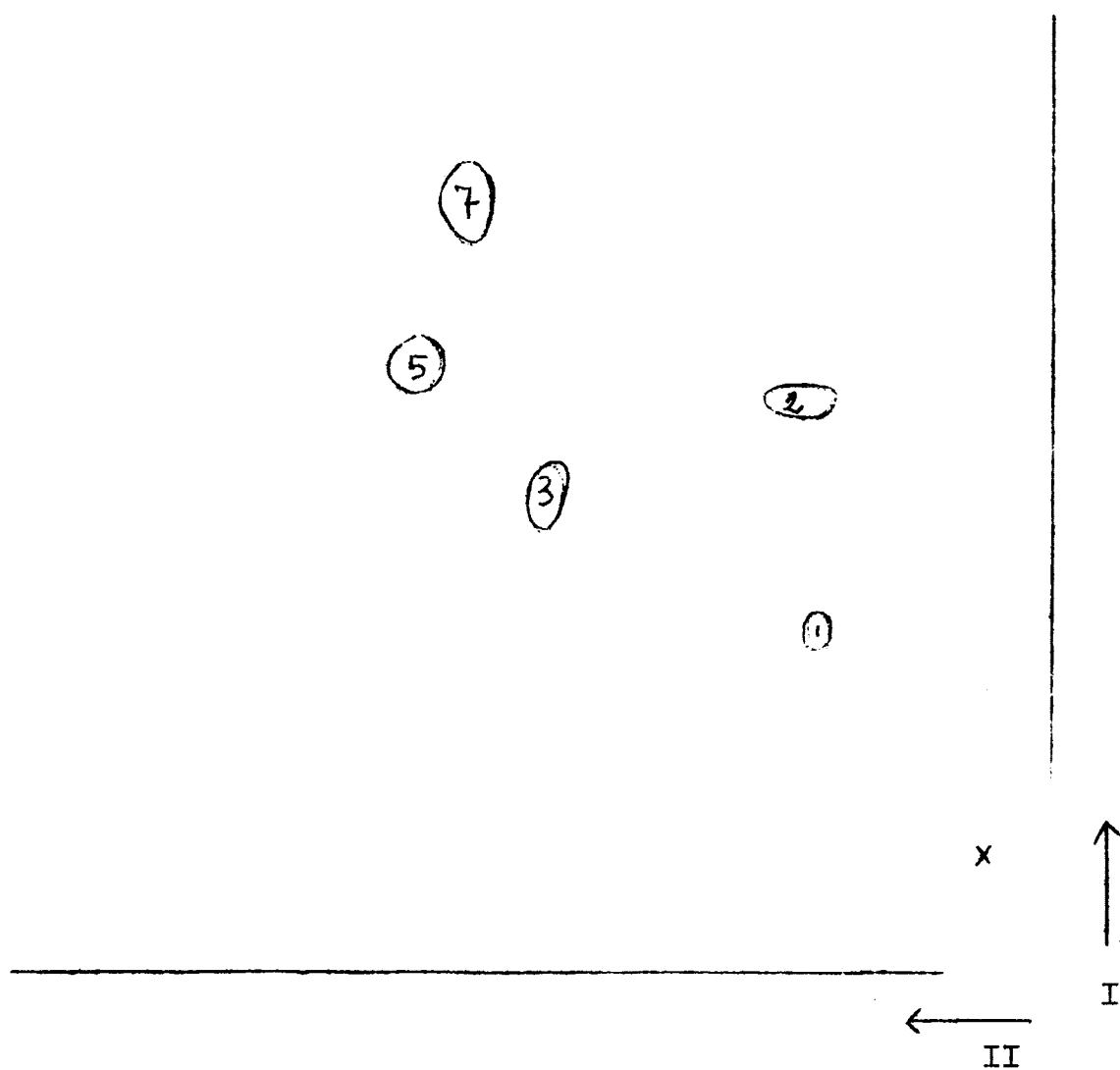
Cebada: granos completos

Hexano/Eter/Ac.Acetico 70:30:1

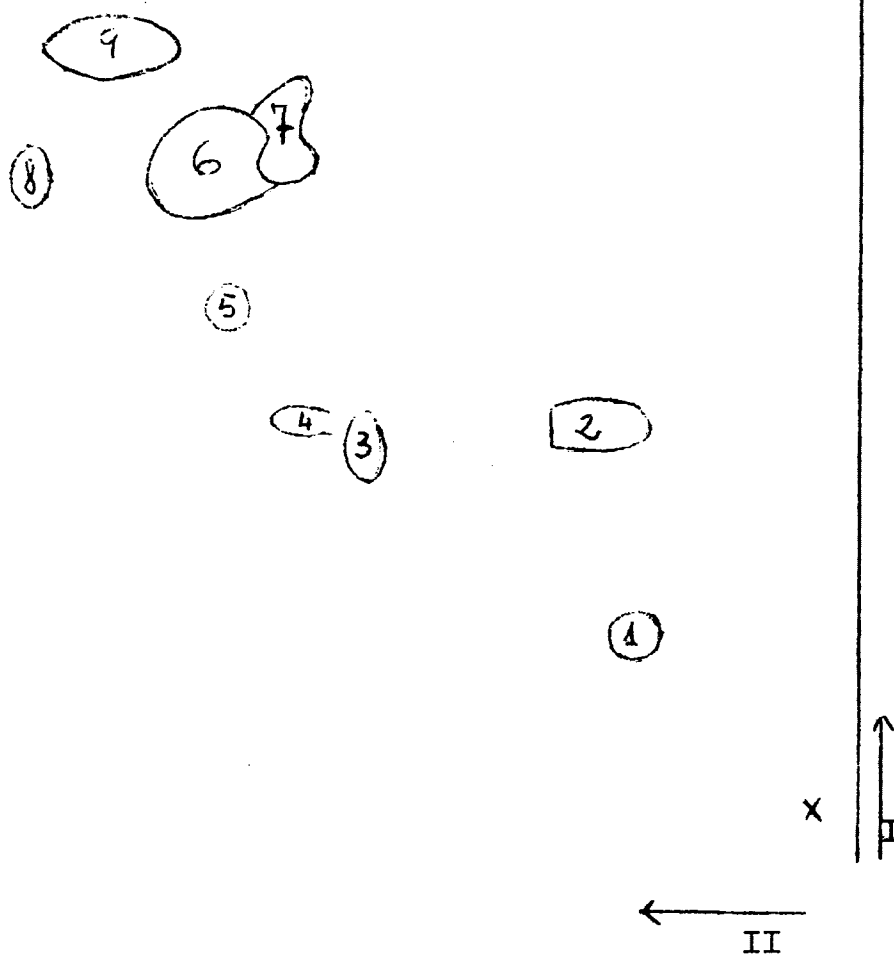


Lípidos constitutivos

Cromatografía bidimensional de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina en I) cloroformo/metanol/agua 65:25:4 y II) butanol/ácido acético/agua 60:20:20



Lípidos polares de cebada



Manchas 1,2,4,6 amarillo naranja con Dragendorff

" 3,5,7,8 rosa con ninhidrina

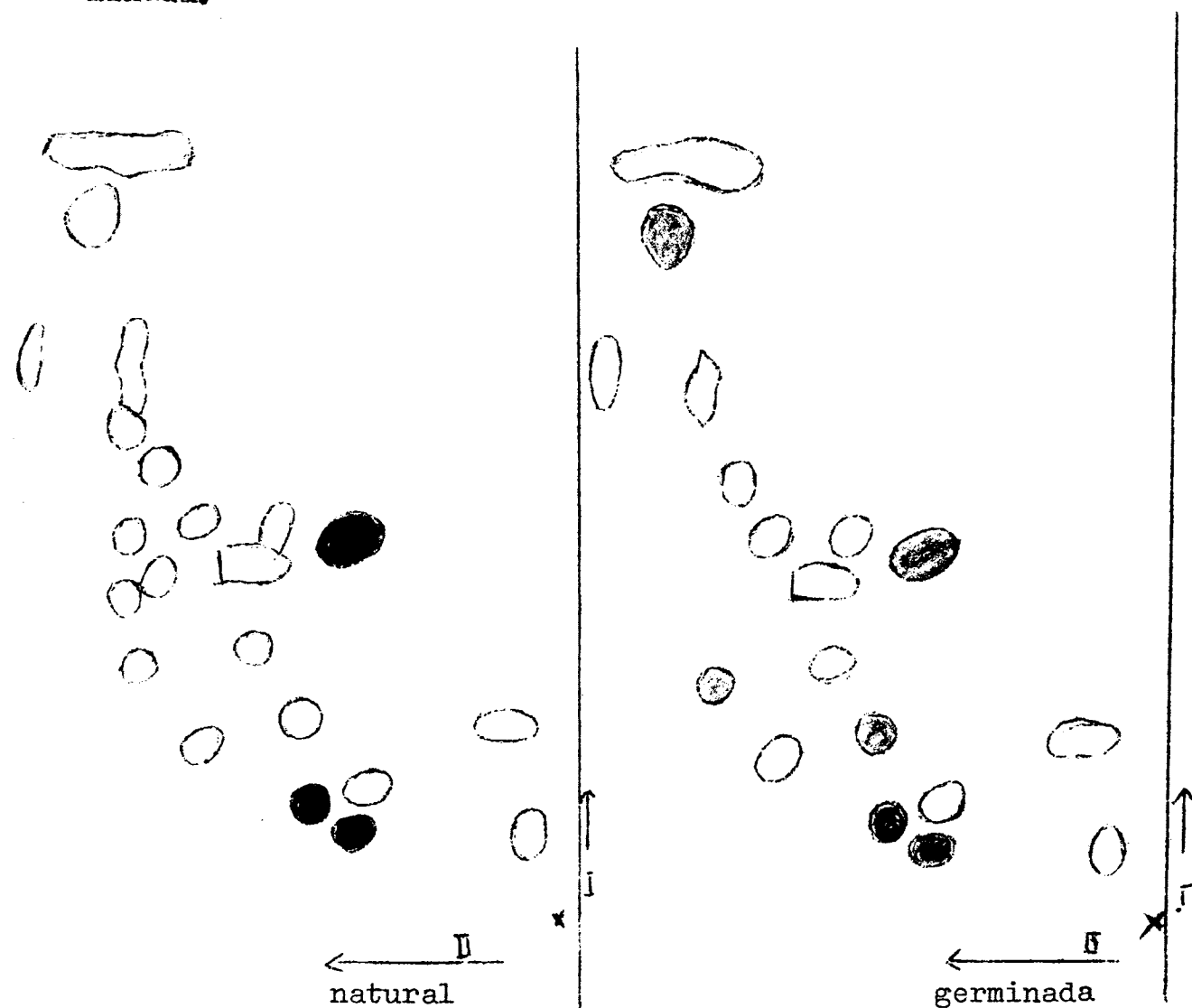
" 6,9 azul con difenilamina

Esto nos indicó que las manchas 1,y 2 revelaban la existen  
cia de colina en lisofosfatidilcolina y fosfatidilcolina.

Las manchas 3,5,7 fosfatidiletanolamina.

Las manchas 9 y 6 mono y digalactosildigliceridos.

Cromatografías comparativas de lípidos de avena natural y germinada.



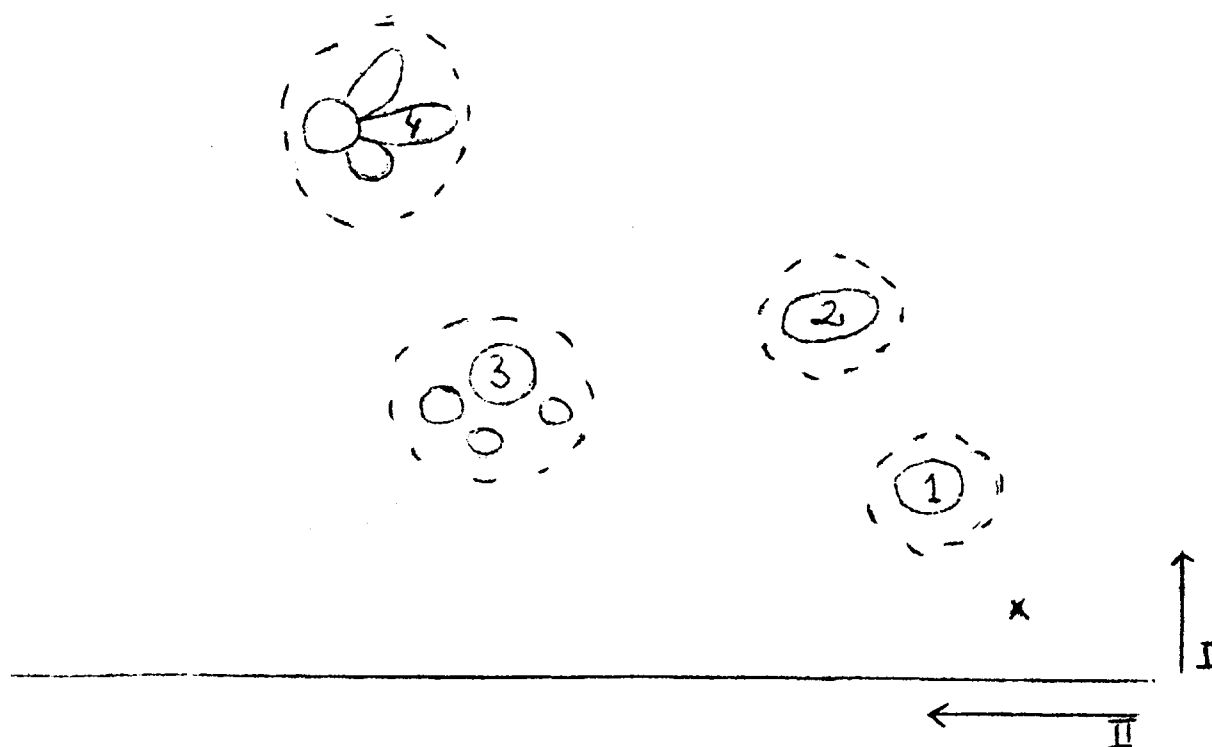
Manchas coloreadas corresponden a fluorescencia con luz U.V.

Manchas sin colorear aparecen amarillo rojizo con iodo.

En avena germinada se acusa fuerte disminución de intensidad en las manchas fluorescentes.

### Determinación cuantitativa de fosforo

Los lípidos polares separados y detectados con vapores de iodo se reagruparon en cuatro zonas.



La determinación cuantitativa de fosforo relativo a estas zona se hizo siguiendo el procedimiento de Rouser.



Cebada natural:

Pesada del ma-  
terial fresco  
gramos

Cincuenta granos completos . . . . .	2,27
Cien embriones . . . . .	0,74
Cien endospermos . . . . .	4,0

Fosforo total en 25  $\mu$ l. . .

<u>Material</u>	<u>Granos completos</u>	<u>Embriones</u>	<u>Endospermos</u>
D.O.	.33	.28	.31
$\times/100\mu$ l	12,45	10,85	12

Fosforo correspondiente a las zonas de placas con 100  $\mu$ l de  
aplicación.

<u>Zonas</u>	<u>D.O./ porcentaje aproximado</u>		
1	.22 / 17	.17 / 15	.28 / 22
2	.53 / 40	.46 / 40,5	.47 / 37
3	.17 / 13	.19 / 16,5	.15 / 12
4	.18 / 13,5	.17 / 15	.16 / 12

Cebada germinada durante dos dias:

	Pesada del material fresco gramos
Cincuenta granos completos	4,27
Cien embriones	1,87
Cien endospermos	6,40

Fosforo total en 25  $\mu$ l.

<u>Material</u>	<u>Granos completos</u>	<u>Embriones</u>	<u>Endospermos</u>
D.O.	.56	.28	.60
8/100 $\mu$ l	21,3	10,5	22,6

Fosforo correspondiente a las zonas de placas con 100  $\mu$ l de aplicación.

<u>Zonas</u>	<u>D.O. / porcentaje aproximado</u>		
1	.58 / 26	.11 / 9,5	.68 / 28,5
2	1.05 / elev.	.57 / elev.	1.10 / elev.
3	.29 / 13	.18 / 16,5	.28 / 11,5
4	.36 / 16	.33 / 29,5	.43 / 18

Avena natural:

	<u>Pesada del material fresco</u> <u>gramos</u>
Cincuenta granos sin cascarilla	1,41
Cien embriones	0,51
Cien endospermos	2,35

Fosforo total en 25  $\mu$ l.

<u>Material</u>	<u>Granos completos</u>	<u>Embriones</u>	<u>Endospermos</u>
D.O.	.37	.24	.52
$\mu$ /100 $\mu$ l	14,05	9,25	19,75

Fosforo correspondiente a las zonas de placas con 100  $\mu$ l de aplicación.

<u>Zonas</u>	<u>D.O. / porcentaje aproximado</u>		
1	.41 / 27	.30 / 30,5	.65 / 31,5
2	.52 / 35	.34 / 35	.51 / 24,5
3	.16 / 11	.14 / 14	.24 / 11
4	.23 / 16	.17 / 17,5	.35 / 17

Avena germinada durante dos días:

	<u>Pesada del material fresco</u> <u>gramos</u>
Cincuenta granos sin cascarilla	2,92
Cien embriones	2,63
Cien endospermos	3,25

Fosforo total en 25  $\mu$ l.

<u>Material</u>	<u>Granos completos</u>	<u>Embriones</u>	<u>Endospermos</u>
D.O.	.44	.35	.49
8/100 $\mu$ l	16,9	13	18,8

Fosforo correspondiente a las zonas de placas con 100  $\mu$ l de aplicación.

<u>Zonas</u>	<u>D.O. / porcentaje aproximado</u>		
1	.60 / 34	.14 / 9,5	.66 / 33,5
2	.65 / 36,5	.70 / 50	.61 / 31
3	.22 / 12,5	.21 / 15	.23 / 12
4	.41 / 23	.49 / 35,5	.38 / 19,5

La determinación cuantitativa de fosforo de estas zonas revela fuerte disminución de lisofosfatidilcolina durante la germinación de estos cereales.

### Determinación del grado de poliinsaturación en ácidos grasos

Las medidas espectrofotométricas realizadas, previa isomerización de los ácidos grasos naturales, nos permitieron obtener datos comparativos entre cereales y sus estados de germinación.

	D.O. 233 nm	
Cebada	Control	Germinada
Granos completos	.440	.703
Embriones	.231	.420
Endospermos	.397	.630
Avena	Control	Germinada
Granos completos	.600	1.110
Embriones	.132	.591
Endospermos	.910	1,320

#### IV.- ACTIVIDAD AIA-OXIDASA

### Análisis de los extractos de raíz y tallo

Se realizaron determinaciones comparativas de hidratos de carbono, proteínas y fenoles en extractos totales, proteicos y no proteicos de raíz y tallo de cebada.

Extracto total : Maceración de 10 gramos de raíz o tallo en 30 ml de H<sub>2</sub>O destilada.  
E.T.  
Fracción proteica : Dialisis del extracto total frente a NaCl 0,1 M durante 18 horas.  
F.P.  
Fracción no proteica : Precipitación en frío de las proteínas con ácido tricloroacético.  
F.N.P.

Estos extractos se cromatografiaron en columnas cargadas con Sephadex G-50 Fine.

La elución se efectuó con NaCl 0,1 M y las fracciones recogidas fueron de aproximadamente 10 ml.

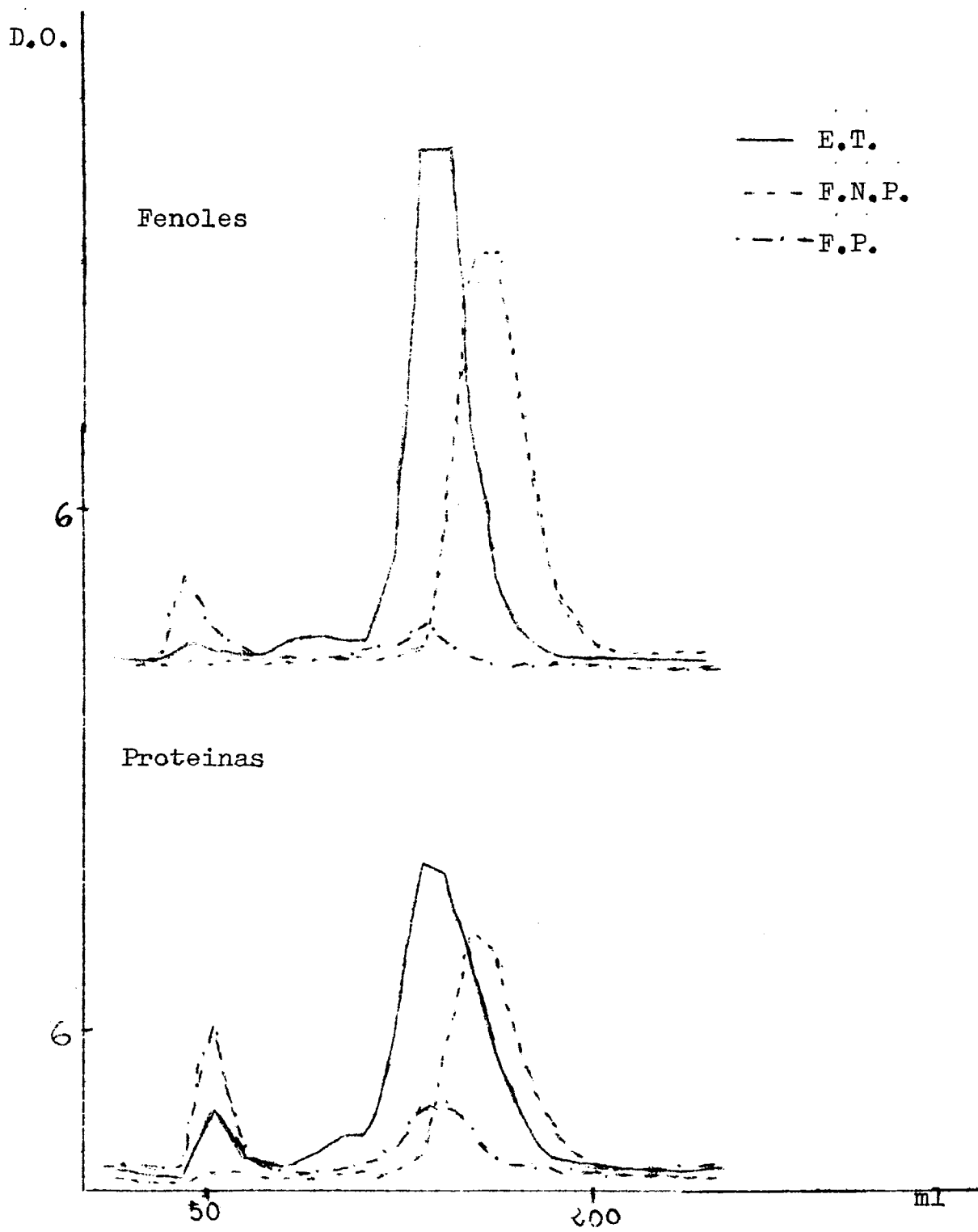
# RAIZ

E.T. : 5 ml de extracto total.  
 F.N.P. : 10 ml de extracto sin proteínas.  
 F.P. : 5 ml de extracto dializado

Eluido	E.T.		F.N.P.			F.P.	
ml	Pr	Fen	Pr	H.C.	Fen	Pr	Fen
10	.005	.000	.005	.000	.000	.070	.000
20	.060	.000	.048	.000	.010	.067	.000
30	.040	.005	.040	.060	.010	.067	.005
40	.038	.005	.045	.080	.010	.083	.010
50	.305	.110	.048	.120	.010	.620	.350
60	.120	.060	.055	.075	.015	.150	.140
70	.095	.050	.047	.080	.020	.077	.050
80	.075	.040	.037	.080	.010	.064	.010
90	.140	.110	.040	.085	.010	.065	.000
100	.187	.110	.055	.190	.010	.070	.010
110	.195	.440	.057	.630	.025	.078	.040
120	.590	2.000	.060	.680	.025	.164	.060
130	1.250	2.000	.120	2.000	.040	.164	.060
140	1.200	.900	.520	1.750	.080	.300	.100
150	.860	.320	1.000	.700	.540	.325	.150
160	.465	.120	.880	.180	1.600	.217	.095



Eluido	E.T.		F.N.P.			F.P.	
	Pr	Fen	Pr	H.C.	Fen	Pr	Fen
ml							
170	.250	.050	.470	.070	1.600	.100	.030
180	.123	.020	.243	.070	.850	.090	.010
190	.083	.020	.128	.070	.350	.085	.000
200	.070	.020	.070	.055	.150	.075	.000
210	.067	.020	.055	.050	.055	.070	.000
220	.068	.020	.065	.040	.055	.063	.000
230	.065	.020	.044	.045	.055	.055	.000
240	.075	.010	.051	.050	.055	.064	.000

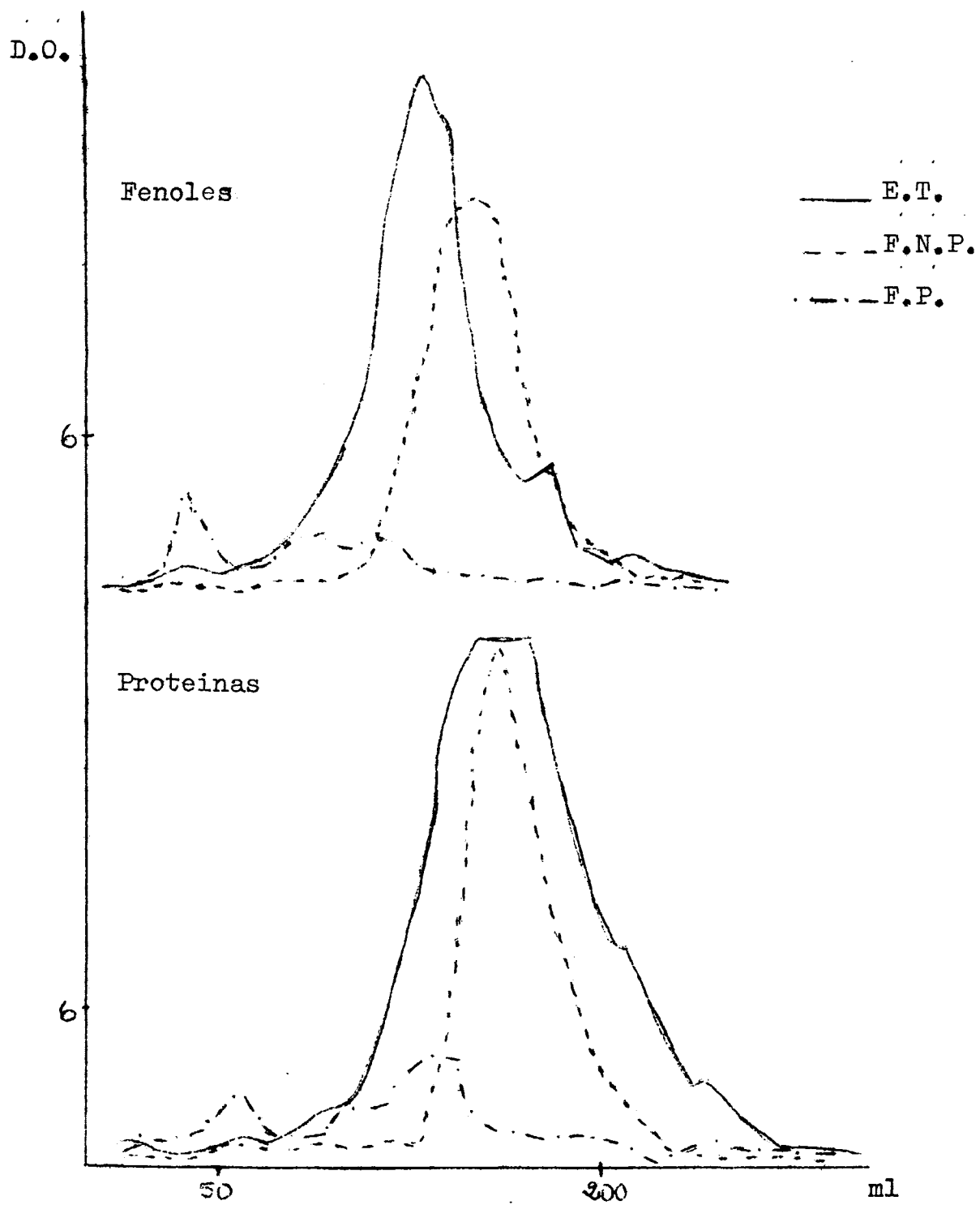


# TALLO

E.T. : 5 ml de extracto total.  
 F.N.P. : 10 ml de extracto sin proteínas  
 F.P. : 5 ml de extracto dializado.

Eluido	E.T.		F.N.P.			F.P.	
	Pr	Fen	Pr	H.C.	Fen	Pr	Fen
10	.040	.005	.029	.000	.000	.065	.000
20	.083	.005	.045	.000	.000	.085	.000
30	.045	.005	.040	.055	.000	.077	.000
40	.035	.005	.030	.060	.005	.095	.055
50	.085	.045	.055	.080	.020	.265	.370
60	.107	.100	.077	.100	.035	.135	.150
70	.070	.050	.045	.070	.010	.083	.090
80	.120	.060	.067	.070	.007	.098	.080
90	.205	.130	.085	.090	.030	.197	.190
100	.233	.210	.052	.120	.140	.180	.190
110	.410	.360	.065	.140	.060	.283	.160
120	.760	.520	.080	.180	.120	.390	.170
130	1.100	.850	.083	1.300	.440	.395	.160
140	1.700	1.600	.520	2.000	.840	.175	.065
150	2.000	2.000	1.600	2.000	1.400	.125	.040
160	2.000	1.800	2.000	2.000	1.500	.105	.035
170	2.000	.950	1.500	2.000	1.400	.097	.035

Eluido	E.T.		F.N.P.			F.P.	
	Pr	Fen	Pr	H.C.	Fen	Pr	Fen
180	1.600	.500	1.000	.820	.760	.103	.040
190	1.050	.410	.625	.082	.430	.097	.030
200	.822	.480	.355	.080	.200	.083	.020
210	.822	.140	.190	.060	.100	.050	.020
220	.470	.100	.100	.060	.050	.035	.010
230	.312	.130	.060	.055	.025	.042	.010
240	.335	.080	.043	.050	.015	.065	.010
250	.195	.030	.043	-	.015	.042	.010
260	.085	.010	.055	-	-	.055	-
270	.077	-	.50	-	-	.025	-
280	.074	-	.032	-	-	.030	-
290	.054	-	.040	-	-	.037	-
300	.058	-	.040	-	-	.035	-

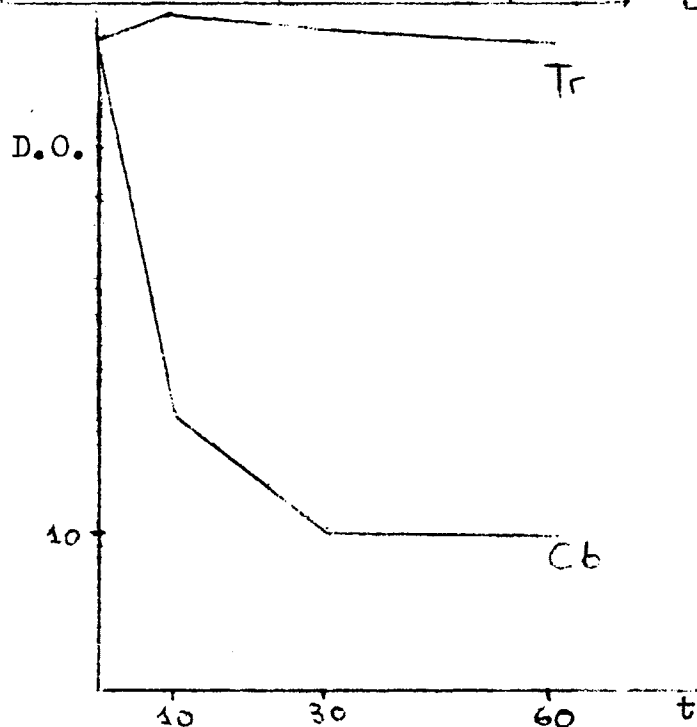


## Actividad enzimática

Los extractos enzimáticos crudos de raíz y tallo de trigo y centeno no muestran actividad. Los de tallo de cebada exhiben un cierto periodo de inducción.

esquema experimental			
	Cb <sub>R</sub>	Tr <sub>R</sub>	Ct <sub>R</sub>
Extracto	1 ml	1 ml	1 ml
Tampon pH 5,6	3,5	3,5	3,5
AIA 200 $\gamma$ /ml	1,5	1,5	1,5

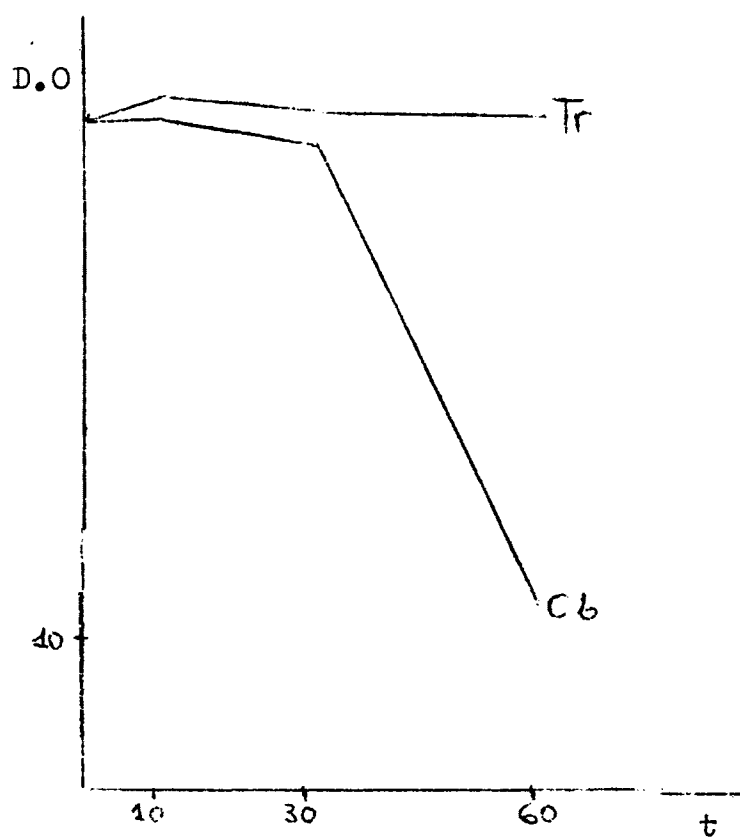
Tiempo - minutos	D.O. x 100		
	Cb <sub>R</sub>	Tr <sub>R</sub>	Ct <sub>R</sub>
10	19	45	45
30	11	44	44
60	10	44	43



Los valores de densidad óptica se representan multiplicados por 100.

esquema experimental		
	$Cb_T$	$Tr_T$
Extracto	1 ml	1 ml
Tampon pH 5,6	3,5	3,5
AIA 200 /ml	1,5	1,5

Tiempo - minutos	D.O x 100	
	$Cb_T$	$Tr_T$
10	45	46
30	43	45
60	12,5	45



### Complejo enzimático funcional

Tratamiento de la preparación enzimática con ~~carbón~~ carbón activo.

esquema experimental				
	I	II	III	IV
Extracto + C	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Tampon pH 5,6	3,5	3,5	3,5	3,5
AIA 200 <del>8</del> / ml	1,5	1,5	1,5	1,5

AIA destruido en %				
Tiempo minu.	I	II	III	IV
10	26	34	11	0
30	45	64	22	5
60	53	75	28	13

I.- Extracto raiz de cebada. III.- Extracto raiz de trigo  
II.- Extracto tallo de cebada. IV.- Extracto tallo de trigo

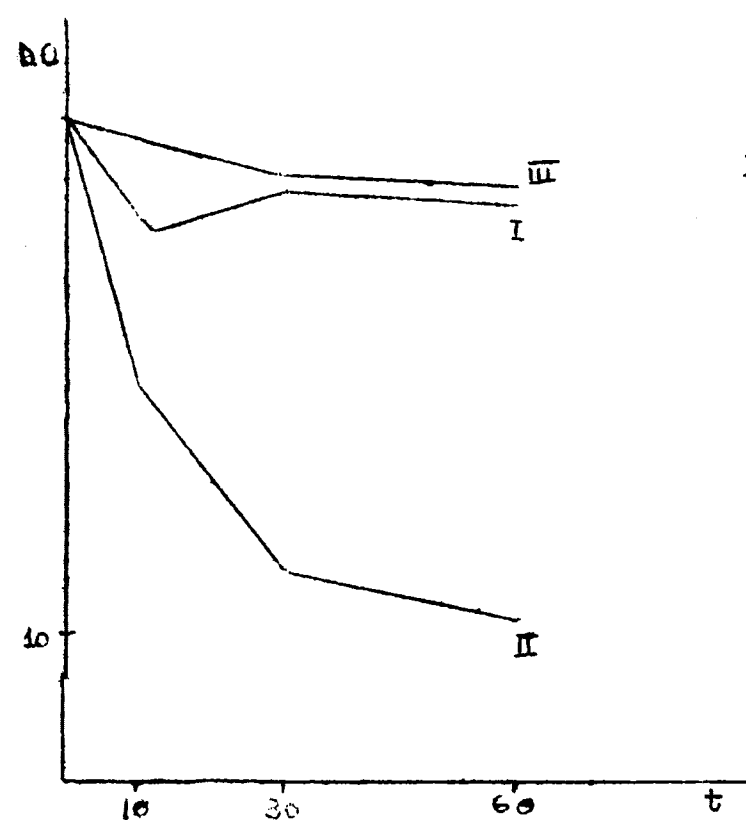
La eliminación de cofactores e inhibidores por tratamiento con carbón activo se hace más ostensible en el extracto de tallo de cebada.



## Cofactores fenólicos

El Ext. ↓ C solo tiene alguna actividad que se refuerza con siderablemente con cofactores fenólicos a concentraciones ade cuadas.

Ext. ↓ C Raíz Centeno



I. -  $Mn^{++} 5 \cdot 10^{-3} + pHC 5 \cdot 10^{-3}$   
 II. -  $Mn^{++} 5 \cdot 10^{-3} + pHC 5 \cdot 10^{-4}$   
 III. -  $Mn^{++} 5 \cdot 10^{-3} + pHC 5 \cdot 10^{-5}$

D.O x 100			
Tiempo minutos	I	II	III
10	38	27	43
30	40	14	41
60	39	11	40

## Cofactores

a) Requerimiento de cofactores fenólicos y activadores metálicos.

### Raiz de cebada

esquema experimental			
	I	II	III
Extracto	1	-	-
Ext. + C	-	1	1
Tampon pH 5,6	3,5	3,5	3,5
Mn <sup>++</sup> $5 \cdot 10^{-3}$	-	-	0,5
pHC $5 \cdot 10^{-4}$	-	-	1
AIA 2000/ ml	1,5	1,5	1,5

Ext. + C significa extracto tratado con carbón activo

AIA destruido en %			
Tiempo min.	I	II	III
10	49	23	62
30	78	42	82
60	79	51	87

Tallo de cebada

esquema experimental				
	I	II	III	IV
Extracto	1	-	-	-
Ext. + C	-	1	1	1
Tampon pH 5,6	3,5	3,5	2,5	2
Mn <sup>++</sup> $5 \cdot 10^{-3}$	-	-	-	0,5
pHC $5 \cdot 10^{-4}$	-	-	1	1
AIA 200 $\gamma$ /ml	1,5	1,5	1,5	1,5

AIA destruido en %				
Tiempo min.	I	II	III	IV
10	0	31	29	72
30	5	62	74	77
60	72	74	77	78

Raiz de trigo

esquema experimental			
	I	II	III
Extracto	1	-	-
Extracto + C	-	1	1
Mn $5 \cdot 10^{-3}$	-	-	0,5
pHC $5 \cdot 10^{-4}$	-	-	1
Tampon pH 5,6	3,5	3,5	2
AIA 200 $\gamma$ /ml	1,5	1,5	1,5

AIA destruido en %			
Tiempo min.	I	II	III
10	0	7	31
30	2	18	74
60	2	24	76

Tallo de trigo

esquema experimental				
	I	II	III	IV
Extracto	1	-	-	-
Ext. + C	-	1	1	1
Mn <sup>++</sup> $5 \cdot 10^{-3}$	-	-	-	0,5
pHC $5 \cdot 10^{-4}$	-	-	1	1
Tampon pH 5,6	3,5	3,5	2,5	2
AIA 200 $\gamma$ /ml	1,5	1,5	1,5	1,5

AIA destruido en %				
Tiempo min.	I	II	III	IV
10	2	0	-	0
30	0	0	-	0
60	4	4	-	0

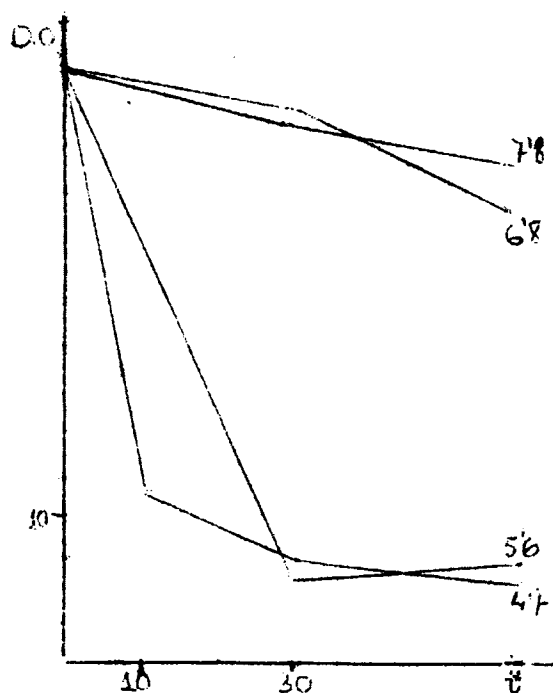
Acción de otros compuestos fenólicos y sustancias relacionadas

AIA destruido en %						
	Ext. + C <sub>R</sub> .Trigo			Ext + C <sub>R</sub> .Centeno		
Tiempo minutos	10	30	60	10	30	60
Fenol $5 \cdot 10^{-3}$	61	71	82	71	79	79
Fenol $5 \cdot 10^{-4}$	8	11	0	5	40	74
Fenol $5 \cdot 10^{-5}$	8	8	0	-	-	-
Vanillinico $5 \cdot 10^{-3}$	6	11	21	-	-	-
Vanillinico $5 \cdot 10^{-4}$	24	29	32	8	24	29
Vanillinico $5 \cdot 10^{-5}$	11	18	21	-	-	-
Ferulico $5 \cdot 10^{-4}$	21	21	18	18	42	27
Protocatetico $5 \cdot 10^{-4}$	18	16	16	18	20	32
Cafeico $5 \cdot 10^{-4}$	21	18	18	18	18	32

Se ha seguido el esquema experimental anterior.

## Efecto de pH

Los extractos de raíz de trigo y centeno, tratados con carbón activo, muestran mayor actividad a pHs ácidos. El esquema experimental es similar a los anteriores sin otra variación que la relativa a la cantidad de extracto.



Trigo				
D.O x 100				
pH Tiempo	4,7	5,6	6,8	7,8
10	.12	27	39	37
30	07	06	37	36
60	06	07	30	33

Centeno				
D.O x 100				
pH Tiempo	4,7	5,6	6,8	7,8
10	15	30	38	-
30	12	13	35	-
60	11	12	32	-

### Activadores metálicos

AIA destruido en %			
Activadores	Ext. + C <sub>R</sub> .Cebada		
Tiempo minutos	10	30	60
Mn <sup>++</sup> 5.10 <sup>-2</sup>	69	77	78
Mg <sup>++</sup> 5.10 <sup>-2</sup>	16	59	64
Co <sup>++</sup> 5.10 <sup>-2</sup>	24	32	51
Ni <sup>++</sup> 5.10 <sup>-2</sup>	28	52	60
Zn <sup>++</sup> 5.10 <sup>-2</sup>	0	50	63

Generalmente se opera a pH 5,6 aún cuando el pH optimo del sistema enzimático sea de 3,5 a 5,6.

Entre los activadores metálicos los iones Mn<sup>++</sup> tienen un efecto muy superior a los iones Mg<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>, Ni<sup>++</sup> y Zn<sup>++</sup>.



## Purificación del sistema enzimático

### a) Dialisis

Extracto crudo ( 2 g de raices frescas de cebada disgregadas en 10 ml de medio tamponado).

Cinco ml de extracto centrifugado en saco de dialisis (Sigma 250-7) frente a la misma solución tamponada de fosfatos 22 mM a pH 5,6 durante veinticuatro horas.

Actividad de los extractos

esquema experimental					
	I	II	III	IV	V
Extracto	1	1	1	1	1
Tampon pH 5,6	3,5	3,5	3,0	2,5	2
Mn <sup>++</sup> $5 \cdot 10^{-3}$	-	-	0,5	-	0,5
pHC $5 \cdot 10^{-4}$	-	-	-	1	1
AIA 200 g/ml	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

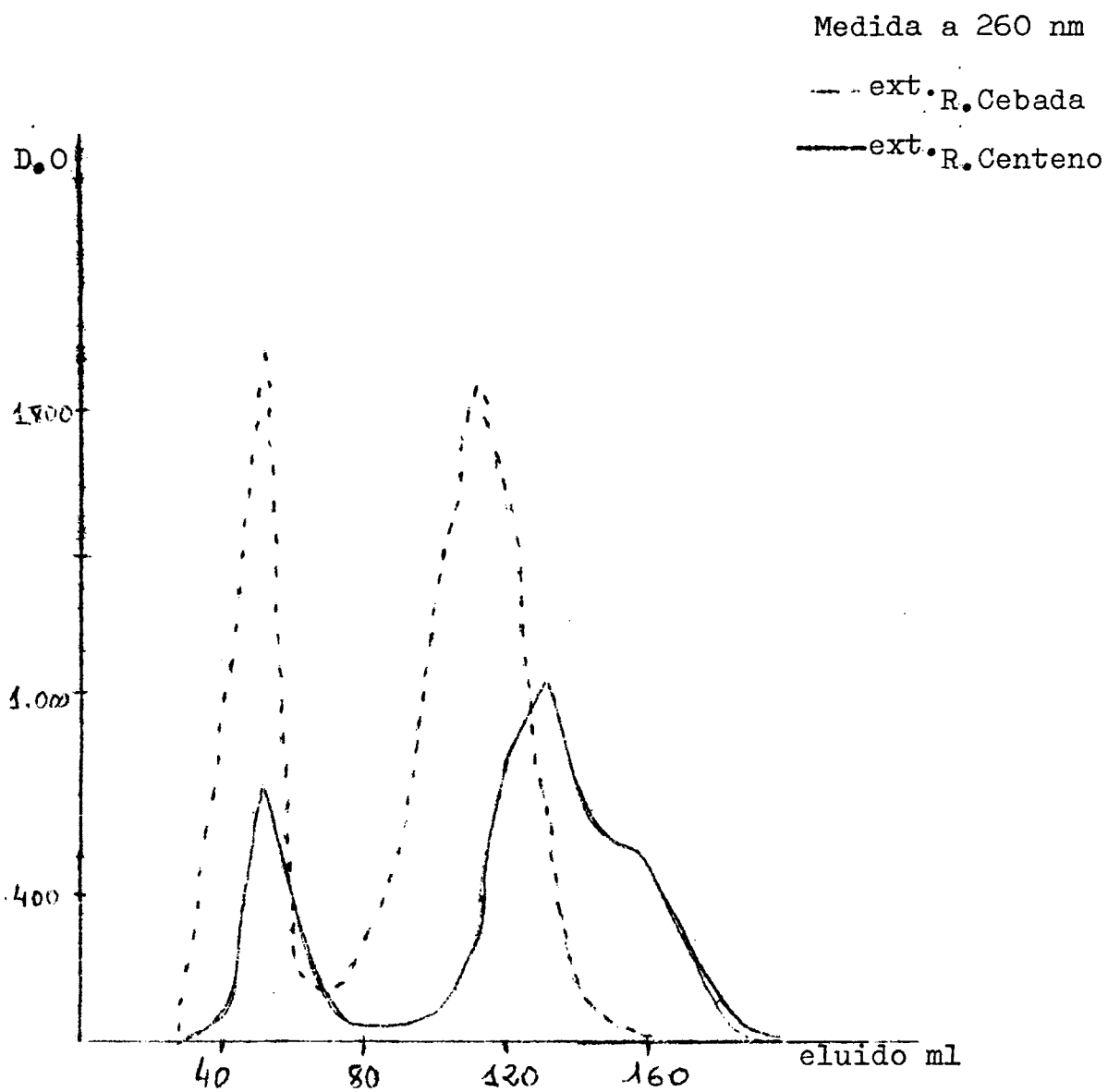
D.O x 100					
Tiempo minutos	I	II	III	IV	V
10	29	33	38	33	33
30	19	26	36	26	24
60	15	22	35	20	18

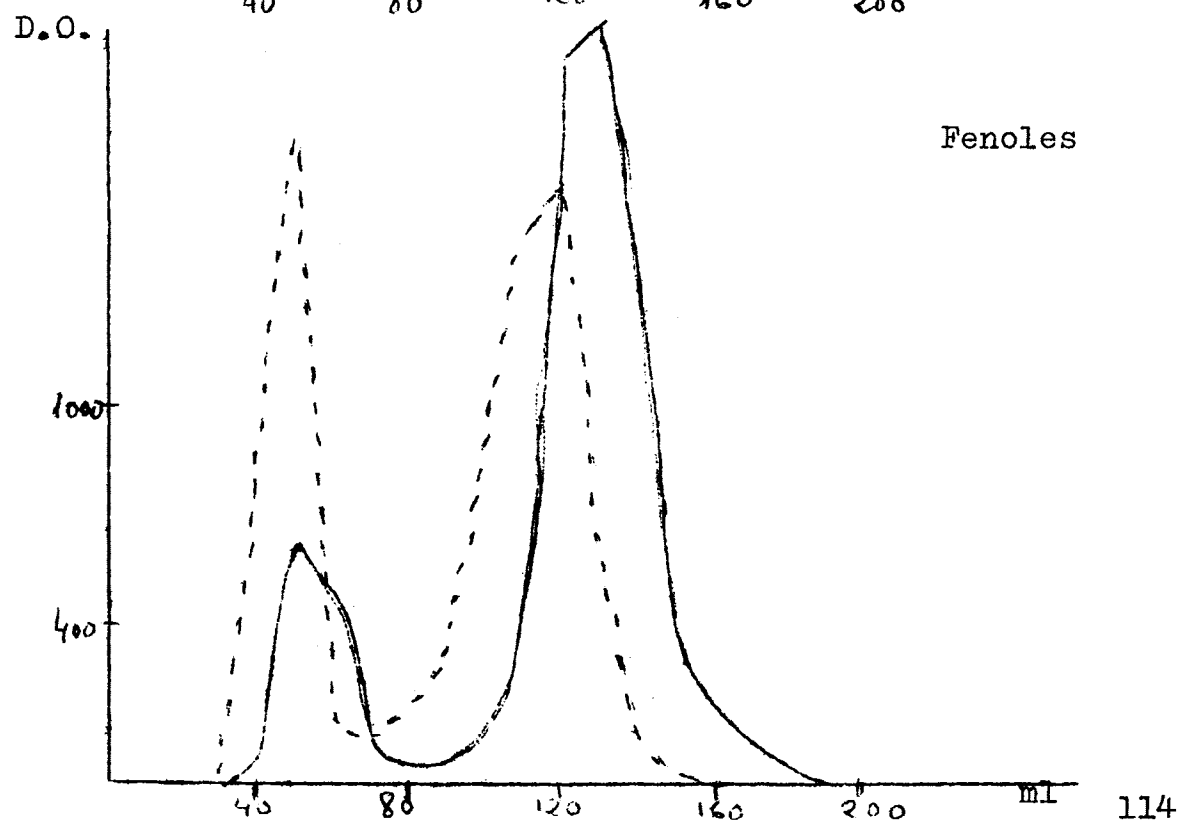
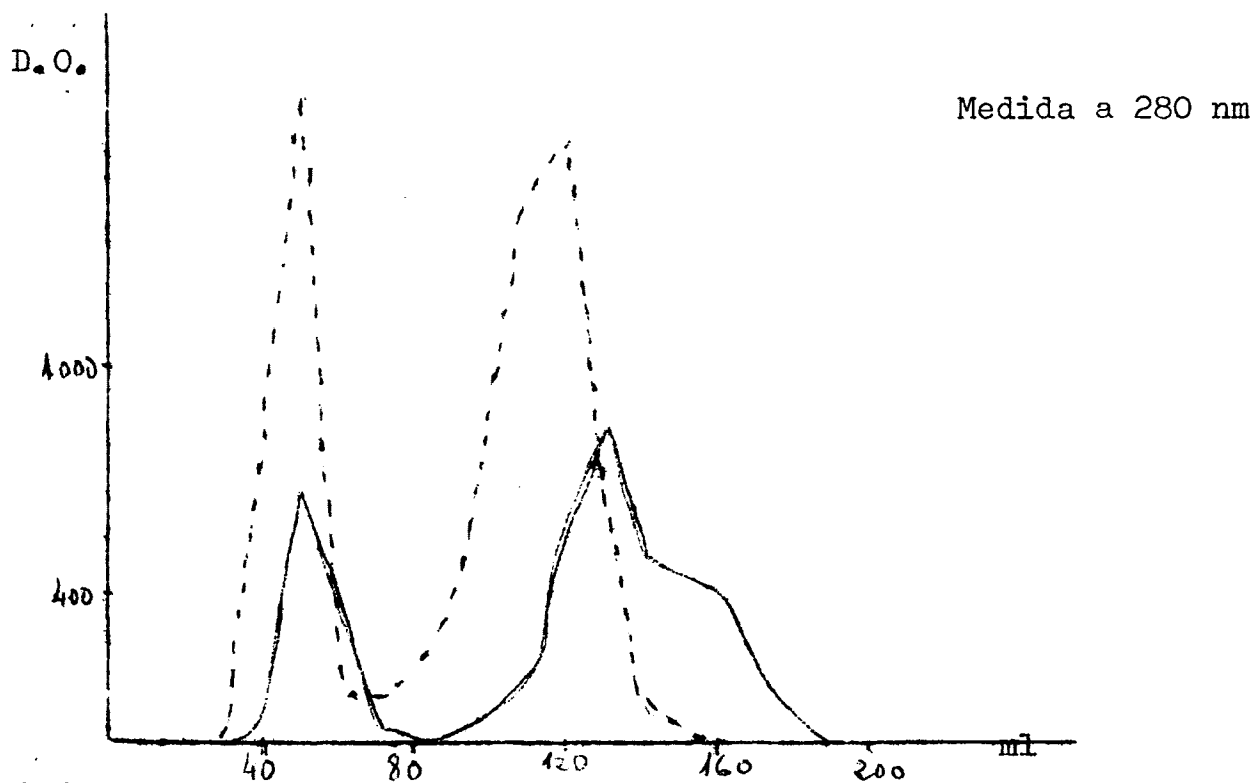
I.- Extracto crudo diluido a la mitad.

II-V.- Extracto dializado, 5 ml diluidos a 10 ml.

b) Cromatografia

10 ml de extracto de raiz (5 g de raices frescas/ 15 ml de medio tamponado) en columnas cargadas con Sephadex G-50.





Raiz de cebada				Raiz de centeno			
Eluido ml	D.O.		Fen.	Eluido ml	D.O.		Fen.
	260nm	280nm			260nm	280nm	
10	.013	.008	.020	10	.017	.015	.015
20	.009	.004	.025	20	.009	.006	.020
30	.011	.005	.025	30	.000	.000	.015
40	.016	.014	.025	40	.940	.770	.560
50	.763	.690	.660	50	2.000	1.750	1.200
60	.317	.313	.480	60	.195	.185	.255
70	.034	.034	.090	70	.158	.132	.120
80	.021	.020	.075	80	.305	.212	.140
90	.032	.025	.075	90	.580	.362	.300
100	.077	.063	.105	100	1.350	.860	1.100
110	.248	.178	.320	110	1.900	1.450	1.600
120	.830	.620	1.900	120	1.500	1.600	2.000
130	1.050	.845	2.000	130	.725	.700	.720
140	.650	.498	1.250	140	.193	.127	.130
150	.555	.440	.405	150	.053	.044	.050
160	.505	.425	.285	160	.026	.025	.035
170	.280	.211	.145	170	.014	.012	.035
180	.075	.060	.055	180	.007	.005	.030
190	.018	.018	.025	190	.008	.006	.020
200	.006	.006	.023	200	.007	.003	.020
210	.024	.019	.027	210	-	-	.015

Actividad enzimática del extracto purificado cromatografi-  
camente.

Raiz

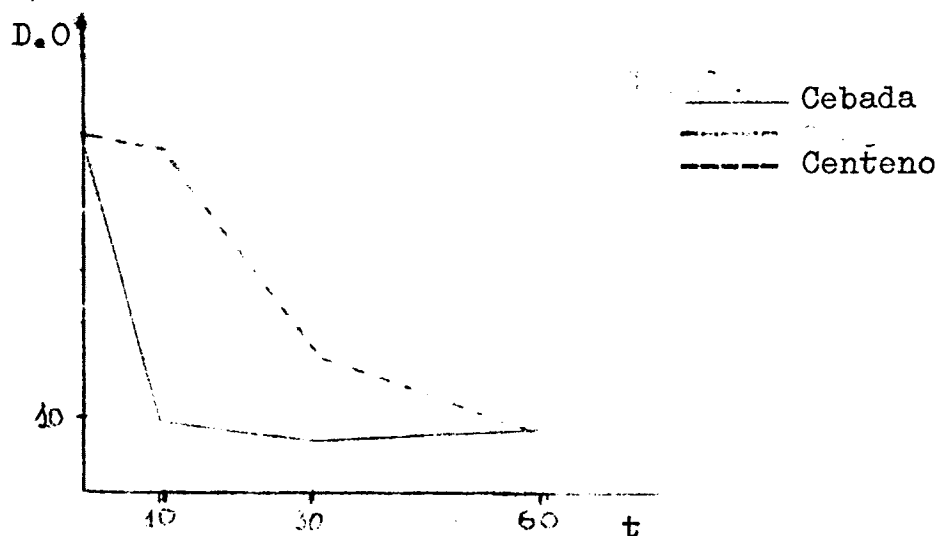
La medida de la actividad enzimática de las fracciones eluidas se efectuó según esquema.

esquema experimental	
Ext. purf. G-50	1,0 ml
Mn <sup>++</sup> $5 \cdot 10^{-3}$ M	0,5 "
pHC $5 \cdot 10^{-4}$ M	1,0 "
Tampon pH 5,8	2,0 "
AIA 200 U/ml	1,5 "

D.O x 100						
Tiempo - minutos	Ext R. Cb 40	Ext R. Ct 40	Ext R. Cb 50	Ext R. Ct 50	Ext R. Cb 60	Ext R. Ct 60
10	15	45	10	47	40	45
30	07	17	08	20	28	45
60	08	09	09	09	18	44

El subíndice indica la fracción de eluido de la columna de Sephadex.

Se representa en D.O. frente a tiempo la fracción de eluido de 50 ml



#### Reactivación con cofactores naturales

La reactivación de las fracciones proteicas con sus cofactores naturales separados cromatograficamente se prueba desde la fracción de 90 ml a partir de la cual comienza a aumentar el contenido en fenoles. Los resultados fueron:

En raiz de cebada: positivo el intervalo 140-170 ml

En raiz de avena : positivo el intervalo 150-160 ml

Probados los eluidos fenólicos de cebada sobre su propio extracto tratado con carbón activo es positivo el intervalo 120-160 ml.

Probados los eluidos de centeno sobre extracto de cebada tratado con carbón activo, es positivo el intervalo 130-150 ml.

La diferencia de actividad entre las fracciones proteicas de raices de cebada y centeno con sus respectivos cofactores naturales se representan para fracciones de eluido 150 y 160 ml.

D.O x 100				
Tiempo - minutos	Ext R. Cb 150	Ext R. Ct 150	Ext R. Cb 160	Ext R. Ct 160
10	35	38	43	35
30	16	28	30	22
60	06	13	18	15

Probadas las fracciones correspondientes al intervalo 100-170 de centeno sobre su extracto natural resultaron todos inactivos. Sin embargo sobre extractos tratados con carbón activo resultaron todos ellos ligeramente activas.

D.O x 100							
Tiempo min.	I	II	III	IV	V	VI	C
10	22	42	41	42	40	46	46
30	11	37	36	35	35	46	-
60	10	32	32	31	31	40	-

Los resultados anteriores se obtuvieron en ensayos realizados según el siguiente esquema.

esquema experimental							
	I	II	III	IV	V	VI	C
Ext. R. Centeno	1	2	2	2	2	2	2
Tampon pH 5,6	2	-	-	-	-	-	3
Mn $5 \cdot 10^{-3}$ M	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
pH $5 \cdot 10^{-4}$ M	1	-	-	-	-	-	-
Frac. 100 ml G-50	-	2	-	-	-	-	-
Frac. 110 ml G-50	-	-	2	-	-	-	-
Frac. 120 ml G-50	-	-	-	2	-	-	-
Frac. 130 ml G-50	-	-	-	-	2	-	-
Frac. 140 ml G-50	-	-	-	-	-	2	-
AIA 200 $\gamma$ / ml	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1



## Tallo

El esquema experimental es similar al seguido para la medida de la actividad enzimática en raíz.

D.O x 100									
Tiempo - minutos	Ext T.Cb 40	Ext T. Tr 40	Ext T.Av 40	Ext T.Cb 50	Ext T.Tr 50	Ext T.Av 50	Ext T.Cb 60	Ext T.Tr 60	Ext T.Av 60
10	17	39	32	16	18	31	30	15	32
30	10	38	23	10	13	19	15	09	31
60	09	40	17	11	13	11	09	09	31

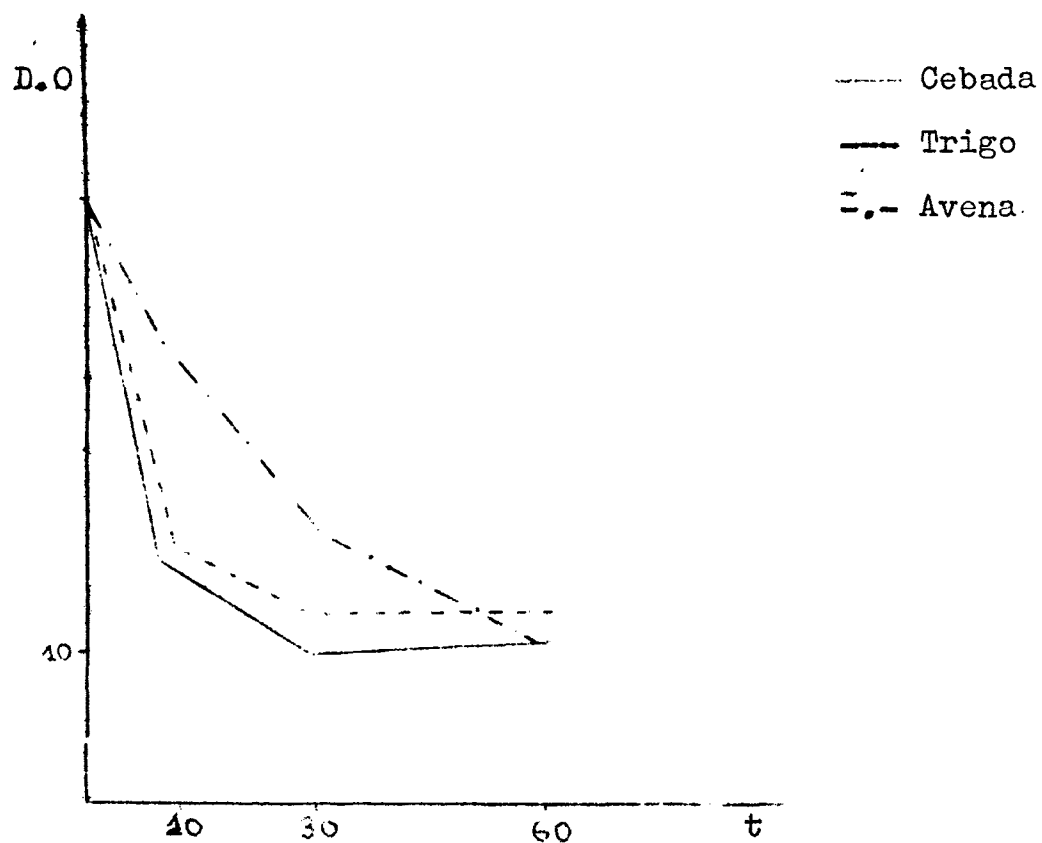
El subíndice indica la fracción de eluido de la columna de Sephadex G-50.

### Reactivación con cofactores naturales

Probados los eluidos fenólicos de tallo de cebada sobre sus propias fracciones proteicas, resultaron positivas en el intervalo de 130-140 ml.

En extractos crudos de raíz de cebada la fracción de 110 ml de tallo de avena mostró acción inhibidora.

Se representa en D.O. frente a tiempo la fracción de elui  
do de 50 ml.



### Fenoles libres

El extracto crudo de raiz de cebada se extrae con acetato de etilo, se elimina el disolvente y el resto solido se disuelve en 10 ml de tampon fosfato pH 6,8, y se cromatografia en columnas de Sephadex G-50.

Fenoles			
ml eluido	D.O.	ml eluido	D.O.
10	.025	120	.700
20	.015	130	.600
30	.020	140	.360
40	.015	150	.150
50	.015	160	.045
60	.010	170	.035
70	.010	180	.040
80	.015	190	.020
90	.030	200	.025
100	.090	210	.020
110	.350	220	.020

Las medidas estan realizadas siguiendo el método colorimetrico del reactivo Folin-Ciocalteus.

Actividad enzimática de las fracciones proteicas purificadas  
cromatograficamente en Sephadex G-200.

La purificación de las fracciones se llevo a cabo en columnas de las mismas características de las anteriores, cargadas con Sephadex G-200.

Columna A : cuya muestra es la primera fracción de la columna de Sephadex G-50.

Columna B : cuya muestra es la segunda fracción activa de la columna de Sephadex G-50.

Columna A. Raiz de Cebada

Eluido ml	D.O.			P-oxds	AIA-oxidasa	
	260 nm	280 nm	Fen	430 nm	10 min.	30 min
10	.127	.103	.050	-	-	-
20	.122	.098	.035	-	-	-
30	.092	.074	.215	.093	.50	.51
40	.620	.523	.590	.135	.48	.45
50	.477	.422	.340	.175	.44	.29
60	.180	.160	.290	.270	.28	.08
70	.216	.200	.340	.330	.13	.07
80	.155	.155	.235	.300	.10	.07
90	.098	.090	.133	.230	.35	.15
100	.152	.120	.098	.150	.47	.39
110	.153	.118	.083	.111	.48	.47
120	.090	.070	.080	-	-	-

Columna A. Raiz de Centeno

Eluido ml	D.O.			P-oxds	AIA-oxidasa	
	260 nm	280 nm	Fen.	430 nm	10 min.	30 min.
10	.067	.056	.045	-	-	-
20	.070	.057	.040	.035	.45	.45
30	.173	.137	.060	.050	.47	.46
40	1.400	1.120	.568	.060	.47	.46
50	.270	.235	.170	.070	.47	.46
60	.185	.157	.170	.110	.28	.04
70	.117	.100	.100	.100	.35	.07
80	.080	.070	.070	.080	.42	.23
90	.056	.046	.070	.070	.43	.34
100	.080	.050	.080	.060	.45	.43
110	.135	.080	.070	.050	.45	.44
120	-	-	-	.050	-	-

Columna B. Raiz de Cebada

Eluido ml	D.O.			P-oxds	AIA-oxidasa	
	260 nm	280 nm	Fen	430 nm	10 min.	30 min.
10	.051	.042	.043	-	-	-
20	.003	.000	.050	-	-	-
30	.144	.120	.100	.137	.43	.44
40	.850	.720	.485	.187	.40	.20
50	.520	.453	.345	.225	.31	.09
60	.525	.453	.190	.300	.14	.08
70	.066	.074	.195	.260	.20	.09
80	.052	.059	.180	.230	.37	.24
90	.017	.025	.145	.183	.42	.37
100	.027	.028	.185	.148	.44	.43
110	.030	.034	.153	.165	.45	.43
120	.000	.000	.063	-	-	-

Columna B. Raiz de Centeno

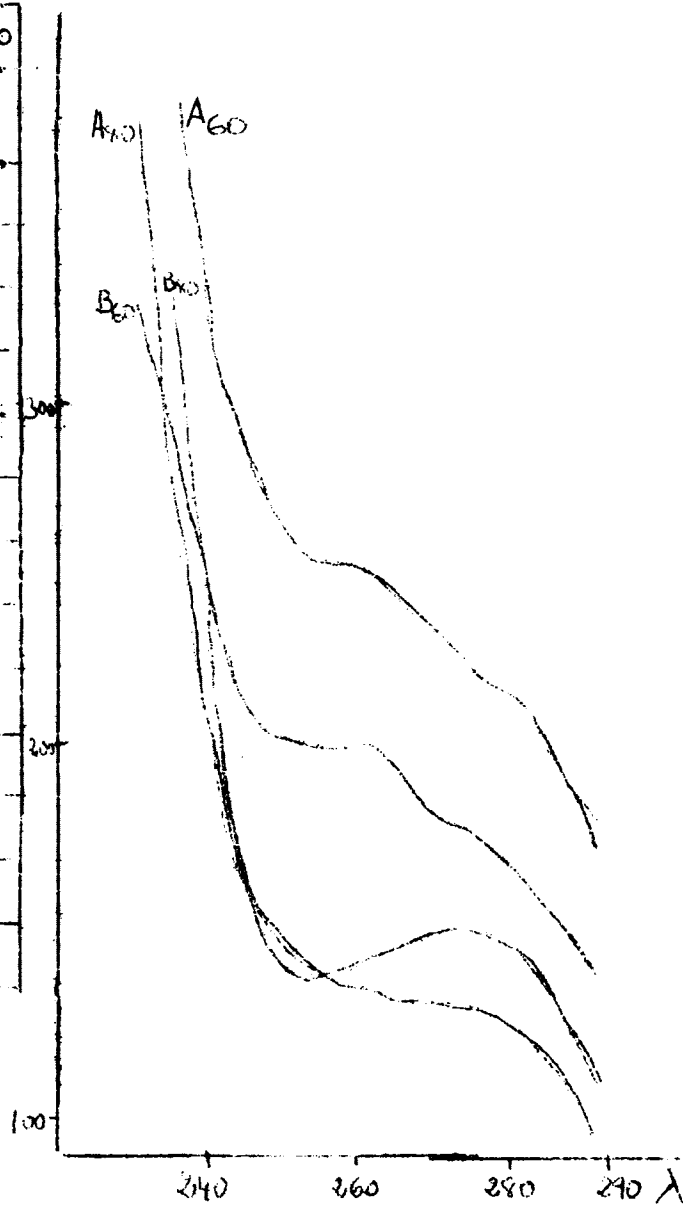
Eluido - ml	D.O.			P-oxds	AIA-oxidasa	
	260 nm	280 nm	Fen	430 nm	10 min.	30 min.
10	.023	.017	.010	.050	•	-
20	.030	.020	.010	.060	-	•
30	.655	.537	.240	.070	-	-
40	1.200	1.000	.570	.110	.44	.42
50	.310	.285	.300	.140	.45	.44
60	.147	.163	.330	.150	.45	.44
70	.140	.164	.350	.280	.45	.39
80	.132	.140	.250	.230	.11	.07
90	.293	.205	.270	.140	.19	.08
100	.590	.345	.560	.100	.28	.12
110	.585	.365	.310	.085	.35	.21
120	.525	.350	.180	.060	.42	.35

En las fracciones obtenidas en la purificación en columna de Sephadex G-200 se aprecia el paralelismo de las actividades AIA oxidasicas y peroxidasicas.



Espectro ultravioleta de las fracciones más activas de las columnas A y B de raíz de cebada y centeno. Se representan en D.O.

$\lambda$ nm	Raíz cebada		Raíz centeno	
	A <sub>80</sub>	B <sub>60</sub>	A <sub>60</sub>	B <sub>80</sub>
230	.381	.330	.505	.560
235	.253	.272	.385	.327
240	.185	.232	.315	.204
245	.155	.205	.285	.157
250	.145	.202	.265	.140
255	.138	.198	.250	.140
260	.136	.199	.247	.143
265	.131	.188	.237	.147
270	.133	.180	.230	.151
275	.130	.177	.222	.150
280	.125	.169	.210	.145
285	.110	.158	.190	.132
290	.097	.142	.174	.110



### Acción del $Mn^{++}$

Efectos de la concentración del  $Mn^{++}$  sobre la fracción proteica activa obtenida en Sephadex G-200 del extracto de raíz de centeno en presencia del cofactor exogeno (pHC  $5 \cdot 10^{-4} M$ ).

AIA destruido en %			
Tiempo minutos	10	30	60
$Mn^{++} 5 \cdot 10^{-3} M$	20	72	82
$Mn^{++} 5 \cdot 10^{-4} M$	6	41	72
$Mn^{++} 5 \cdot 10^{-5} M$	0	15	42

V.- COMPLEJOS AUXINA-QUINONA

Acción directa AIA-piropalol

esquema experimental								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Piropalol $5.10^{-3}$ M	-	1	-	-	-	1	-	-
Piropalol $5.10^{-4}$ M	-	-	1	-	-	-	1	-
Piropalol $5.10^{-5}$ M	-	-	-	1	-	-	-	1
Tampon pH 5,6	4,5	3,5	3,5	3,5	-	-	-	-
Tampon pH 7,8	-	-	-	-	4,5	3,5	3,5	3,5
AIA 200X/ml	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Tiempo - minutos	D.O.							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
10	.43	.05	.34	.40	.42	.07	.41	.43
30	-	.04	.36	.42	-	.06	.40	.44

El piropalol en su efecto directo con el AIA requiere con centraciones del orden de  $5.10^{-3}$  M para la formación del complejo, dependiendo poco del pH.

# Acción del sistema AIA-oxidasa

esquema experimental									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	C
Extracto	1	1	1	1	1	1	1	1	-
Piragalol $5 \cdot 10^{-3}$ M	-	1	-	-	-	1	-	-	-
Piragalol $5 \cdot 10^{-4}$ M	-	-	1	-	-	-	1	-	-
Piragalol $5 \cdot 10^{-5}$ M	-	-	-	1	-	-	-	1	-
Tampon pH 5,6	3,5	2,5	2,5	2,5	-	-	-	-	4,5
Tampon pH 7,8	-	-	-	-	3,5	2,5	2,5	-	-
AIA 200 $\gamma$ /ml	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Tiempo - minutos	D.O.								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	C
10	.22	.06	.44	.32	.44	.08	.43	.44	.45
30	.11	.06	.43	.13	.42	.10	.43	.43	-
60	.09	.07	.42	.10	.41	.13	.42	.41	-

Extracto: Obtenido de raíces frescas de plantulas de cebada.

## Acción enzimática de la peroxidasa

esquema experimental									
Peroxidasa 100 /ml	1	1	1	1	1	1	1	1	C
Pirogalol $5 \cdot 10^{-3}$ M	-	1	-	-	-	1	-	-	-
Pirogalol $5 \cdot 10^{-4}$ M	-	-	1	-	-	-	1	-	-
Pirogalol $5 \cdot 10^{-5}$ M	-	-	-	1	-	-	-	1	1
Tampon pH 6,8	3,5	2,5	2,5	2,5	-	-	-	-	4,5
Tampon pH 7,8	-	-	-	-	3,5	2,5	2,5	2,5	-
AIA 2000/ml	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

tiempo min.	D.O.								
10	.38	.04	.40	.47	.43	.09	.42	.46	.47
30	.30	.04	.40	.47	.39	.09	.43	.41	
60	.23	.05	.40	.42	.33	.12	.43	.33	
120	.16	.06	.41	.25	.25	.19	.43	.25	
180	.12	.06	.43	.16	.21	.26	.44	.22	

El comportamiento de la peroxidasa es similar al observado con el extracto enzimático. Desenmascarando en las proximidades de su pH optimo a la fitohormona acomplexada.

Activación de la acción enzimática con  $H_2O_2$

esquema experimental										
Extracto	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-
eroxidasa	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1
Pirogalol $5 \cdot 10^{-3}$ M	-	1	-	1	-	-	1	-	1	-
Pirogalol $2,5 \cdot 10^{-3}$ M	-	-	1	-	1	-	-	1	-	1
Tampon pH 6,8	3,5	2,5	2,5	1,5	1,5	3,5	2,5	2,5	1,5	1,5
$H_2O_2$ 0,3%	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1

Tiempo min	D.O.									
10	.40	.06	.13	.06	.13	.44	.05	.13	.06	.11
30	.26	.06	.16	.42	.36	.36	.06	.15	.39	.35
60	.16	.07	.18	.42	.37	.30	.06	.15	.39	.35

Acción del  $H_2O_2$

esquema experimental							
	I	II	III	IV	V	VI	C
Extracto	1	1	1	1	-	-	-
Pirogalol $5 \cdot 10^{-3} M$	-	-	1	-	1	-	-
Pirogalol $2,5 \cdot 10^{-3} M$	-	-	-	1	-	1	-
Tampon pH 5,6	3,5	2,5	1,5	1,5	2,5	2,5	4,5
AIA 200 $\mu$ /ml	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
$H_2O_2$ 0,3%	-	1	1	1	1	1	-

Tiempo - minutos	D.O.						
	I	II	III	IV	V	VI	C
10	.17	.38	.47	.43	.06	.11	.48
30	.11	.34	.47	.42	.05	.11	
60	.10	.30	.45	.40	.04	.14	



Acción del  $H_2O_2$

esquema experimental									
	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	C
Pirogalol $5 \cdot 10^{-3} M$	-	-	-	1	-	1	-	-	-
Pirogalol $2,5 \cdot 10^{-3} M$	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Tampon pH 6,8	3,5	2,5	1,5	1,5	1,5	2,5	2,5	3,5	4,5
AIA 200 $\mu$ /ml	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
$H_2O_2$ 0,3%	1	-	1	1	1	1	1	-	-

Tiempo - minutos	D.O.								
	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	C
10	.35	.39	.37	.45	.41	.06	.10	.35	.48
30	.35	.28	.28	.45	.40	.06	.10	.34	
60	.35	.20	.20	.45	.34	.06	.13	.35	

El agua oxigenada activa marcadamente los procesos enzimáticos oxidativos de los polifenoles, pero inhibe algo el de la fitohormona.

Acción de distintos compuestos fenólicos

D.O.									
solución tamponada pH 5,6									
	Con ext enzimático					Sin ext enzimático			
Tiempo minutos	5	15	30	60	Tiempo minutos	5	15	30	60
Pirogalol $5 \cdot 10^{-3} M$	.20	.02	.19	.22	Pirogalol $5 \cdot 10^{-3} M$	.15	.13	.10	.09
Pirocateq $5 \cdot 10^{-3} M$	.07	.07	.06	.05	Pirocateq $5 \cdot 10^{-3} M$	.06	.09	.07	.06
HdQ $5 \cdot 10^{-3} M$	.13	.10	.08	.07	HdQ $5 \cdot 10^{-3} M$	.11	.18	.19	.19
MH $5 \cdot 10^{-3} M$	.22	.04	.05	.03	MH $5 \cdot 10^{-3} M$	.43	.30	.29	.29
Resorcina $5 \cdot 10^{-3} M$	.21	.04	.05	.04	Resorcina $5 \cdot 10^{-3} M$	.22	.21	.20	.17
					Florog. $5 \cdot 10^{-3} M$	.08	.10	.09	.09

El  $H_2O_2$  al 0,3 por ciento, se adiciona a los 10 minutos.

D.O.									
Solución tamponada pH 7,8									
	Con ext enzimático					Sin ext enzimático			
Tiempo minutos	5	15	30	60	Tiempo minutos	5	15	30	60
Pirogalol $5 \cdot 10^{-3}M$	.00	.34	.34	.35	Pirogalol $5 \cdot 10^{-3}M$	.00	.00	.00	.00
Pirocateq $5 \cdot 10^{-3}M$	.18	.24	.25	.26	Pirocateq $5 \cdot 10^{-3}M$	.16	.12	.10	.09
HdQ $5 \cdot 10^{-3}M$	.06	.22	.25	.26	HdQ $5 \cdot 10^{-3}M$	.05	.11	.10	.09
pQ $5 \cdot 10^{-3}M$	.07	.23	.27	.29	pQ $5 \cdot 10^{-3}M$	.13	.26	.27	.26
MH $5 \cdot 10^{-3}M$	.44	.28	.26	.27	MH $5 \cdot 10^{-3}M$	.45	.32	.32	.30
Resorcina $5 \cdot 10^{-3}M$	.26	.24	.22	.23	Resorcina $5 \cdot 10^{-3}M$	.26	.22	.22	.22
					Florog. $5 \cdot 10^{-3}M$	.08	.10	.10	.09

En el estudio de los distintos compuestos fenólicos probados destacamos el efecto de la pirocatequina, similar al observado por Gaspar. La resorcina se asemeja en su acción frente a la auxina a la maleico hidracida, permitiendo incluso el progreso de la acción enzimática, lo que podría interpretarse por incapacidad de formación de quinona.

VI.- INHIBIDORES NATURALES DE LA  
GERMINACION

### Acción de las envolturas externas

La germinación se realizó con granos de cebada normales y otros con el embrión descubierto, en distintos medios, durante dos días a 18 °C de temperatura en estufa.

Medios.-

Control : Sol. tamponada de fosfatos 22 mM, pH 6,8  
Ac. cafeico : Sol.  $5 \cdot 10^{-3}$  M de ac. cafeico en tampon 6,8  
Ac. clorogenico : Sol.  $5 \cdot 10^{-3}$  M de ac. clorogenico en solución tamponada, pH 6,8

	Longitud de raiz	
	cm	
	Cebada normal	Cebada descubierta
Control	1,6	2,2
Cafeico	1,24	1,6
Clorogenico	0,82	1,1

Se observa que el hecho de descubrir el embrión facilita la germinación y que sustancias naturales como las probadas inhiben de forma distinta probablemente en función de su permeabilidad, intimamente relacionada con su solubilidad en los medios.

### Prueba respiratoria

Avena con sus envolturas externas germinó en cajas/petri con 2 ml de H<sub>2</sub>O y antibiotico durante veinticuatro y setenta y dos horas, a 18 °C de temperatura.

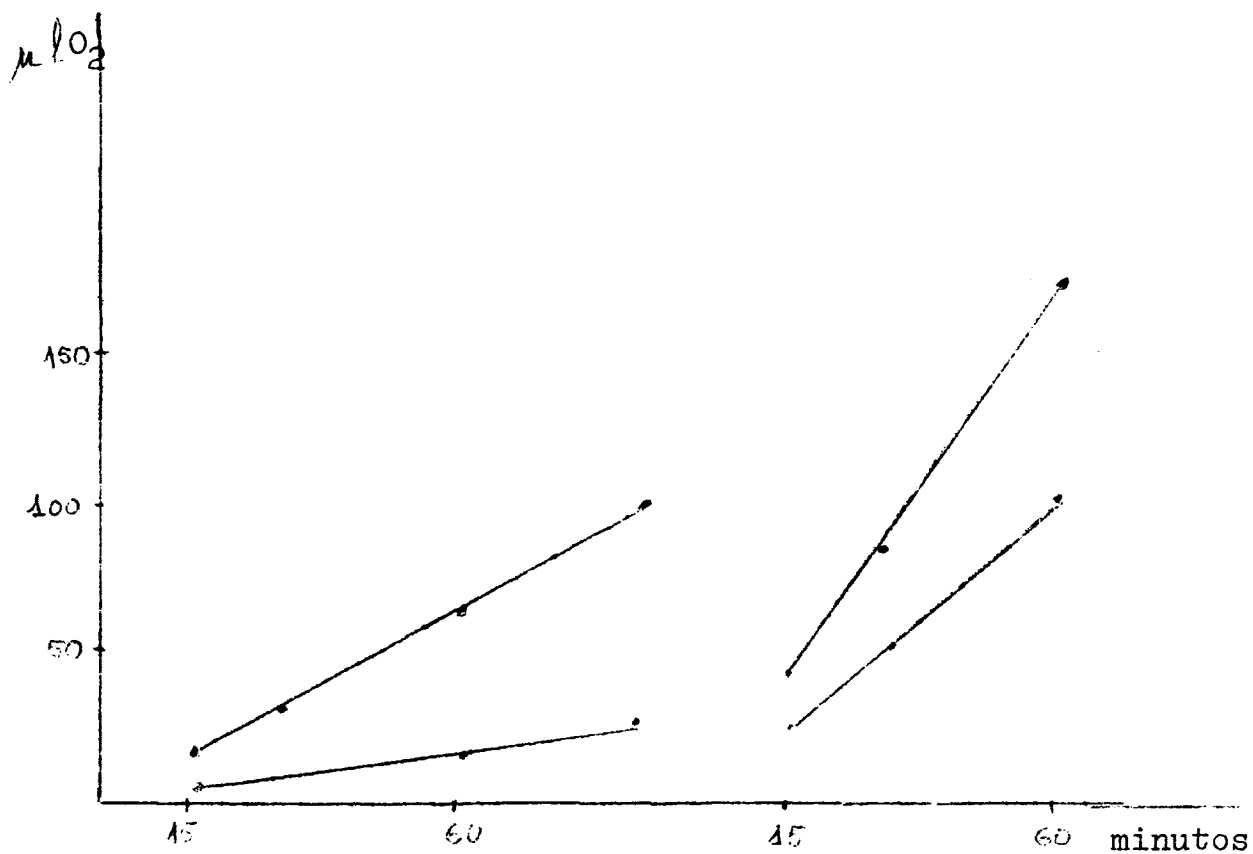
Determinación del estado respiratorio de 10 granos, con 1 ml de agua y 0,1 ml de antibiotico.

#### Veinticuatro horas de germinación

	Avena con envolturas			Avena sin envolturas		
Tiempo - minutos	$\mu$ 1 O <sub>2</sub>	$\mu$ 1 CO <sub>2</sub>	$\frac{CO_2}{O_2}$	$\mu$ 1 O <sub>2</sub>	$\mu$ 1 CO <sub>2</sub>	$\frac{CO_2}{O_2}$
15	3,13	8,1	2,6	15,9	21,0	1,32
30	4,35	10,0	2,3	16,4	20,5	1,24
60	9,4	21,0	2,2	33,5	38,5	1,14
90	9,4	21,5	2,5	36,0	37,4	1,04

#### Setenta y dos horas de germinación

	Avena con envolturas			Avena sin envolturas		
Tiempo - minutos	$\mu$ 1 O <sub>2</sub>	$\mu$ 1 CO <sub>2</sub>	$\frac{CO_2}{O_2}$	$\mu$ 1 O <sub>2</sub>	$\mu$ 1 CO <sub>2</sub>	$\frac{CO_2}{O_2}$
15	27,5	29,4	1,06	44,0	48,3	1,1
30	25,6	32,5	1,26	43,5	57,0	1,3
60	54,0	73,0	1,34	92,0	102,0	1,1



En granos completos de avena germinados el cociente respiratorio indica predominio fermentativo. Al ser desprovistos de sus envolturas externas inmediatamente aumentan su consumo de oxígeno y la disminución del cociente respiratorio manifiesta el consumo de hidratos de carbono en proceso aeróbico.

### Acción de diversos compuestos naturales

La extracción exhaustiva con cloroformo/metanol 2:1 de en volturas externas de avena o granos completos molidos rinde un 1,5 ó 7 por ciento respectivamente de compuestos solubles en cloroformo.

#### a) Separación de fosfolipidos

De una solución de 2 gramos de material extraído en eter, tratado con 50 ml de acetona a baja temperatura se obtuvo un precipitado que se redisolvió en 10 ml de cloroformo. Las aguas madres se concentraron a 10 ml.

#### b) Ensayo germinativo

En cajas/petri con 2,5 ml de las soluciones anteriores y previa eliminación del disolvente organico, se colocaron 25 se millas esterilizadas, adicionando el medio basico inorganico normal. La germinación se llevó a cabo durante tres dias.

	<u>Avena sin cascarilla</u>		<u>Cebada normal</u>	
	<u>L.R.</u>	<u>G.G.</u>	<u>L.R.</u>	<u>G.G.</u>
Fosfolip.	1,7	12	1,8	18
Otros compuestos.	0,8	15	0,15	25

L.R.- Longitud de raiz en cm.

G.G.- Granos con germinación visible.



### Fraccionamiento cromatografico

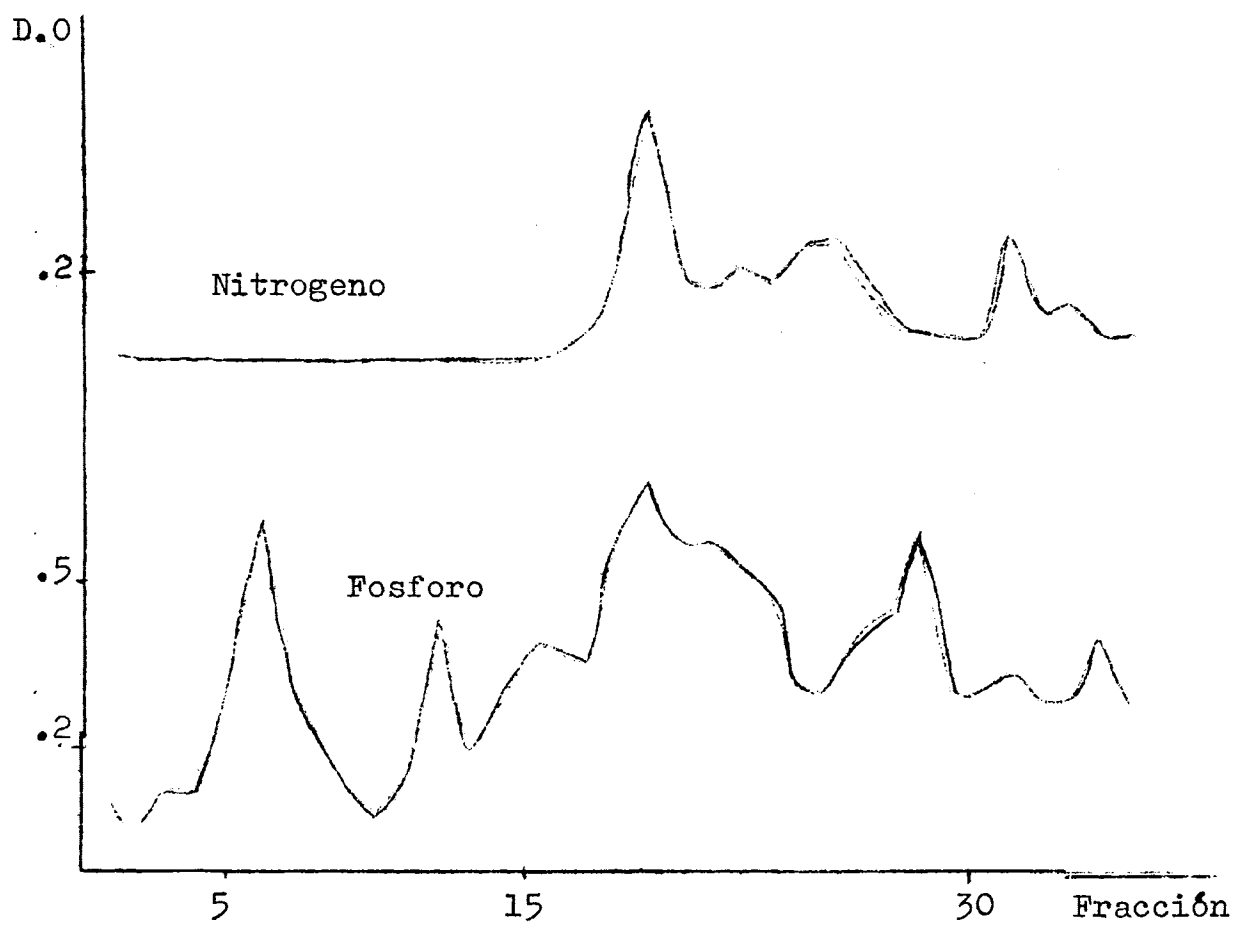
I.- El fraccionamiento de 4,6 g de extracto total disueltos en 15 ml de cloroformo, se realizó en columnas de 65x3 cm, con 195 gramos de Gel de Silice, 100-200 mesh como absorbente y utilizando eluyentes con polaridad creciente.

Las fracciones eluidas de aproximadamente 50 ml se concentraron a 10 ml y de estos se tomaron muestras de 2 ml para digestión con acido sulfurico. Terminada la digestión se diluyeron a 10 ml, tomando 1 ml y 2 ml para determinación de fosforo y nitrogeno respectivamente, resultados que se expresan en D.O.

La prueba germinativa corresponde a 5 ml de las fracciones eluidas concentradas, previa eliminación del disolvente organico, con medio basico normal y 25 granos de cebada en estufa a 18 °C durante tres dias.

Fracción	Eluyente	Fosforo	Nitrogeno	L.R.	G.G.
1	Cloroformo	.10	.000	2,0-2,5	14
2	"	.07	.000	2,5-3,0	21
3	"	.13	.000	2,5-3,0	24
4	"	.13	.005	3,0-3,5	20
5	"	.29	.000	1,5-2,0	19
6	"	.60	.005	1,0-1,5	18

7	Cloroformo	.30	.000	2,0-2,5	24
8	"	.21	.005	2,0-2,5	17
9	"	.14	.010	2,0-2,5	20
10	Clorof/Met 9:1	.09	.010	2,0-2,5	20
11	"	.15	.010	1,5-2,0	17
12	"	.42	.005	0	0
13	"	.19	.005	1,5-2,0	18
14	"	.26	.005	2,0-2,5	17
15	"	.36	.005	2,0-2,5	18
16	"	.35	.005	1,5-2,0	13
17	"	.34	.000	2,5-3,0	22
18	"	.56	.260	0	0
19	Clorof/Met 4:1	.66	.490	0,5-1,0	7
20	"	.55	.200	1,5-2,0	19
21	"	.55	.180	1,5-2,0	23
22	"	.51	.210	1,0-1,5	18
23	"	.48	.190	1,0-1,5	15
24	"	.30	.250	1,0-1,5	15
25	"	.30	.260	1,5-2,0	21
26	"	.40	.190	2,0-2,5	22
27	Clorof/Met 1:1	.43	.110	2,0-2,5	14
28	"	.57	.110	2,0-3,0	22
29	"	.28	.110	2,0-2,5	20



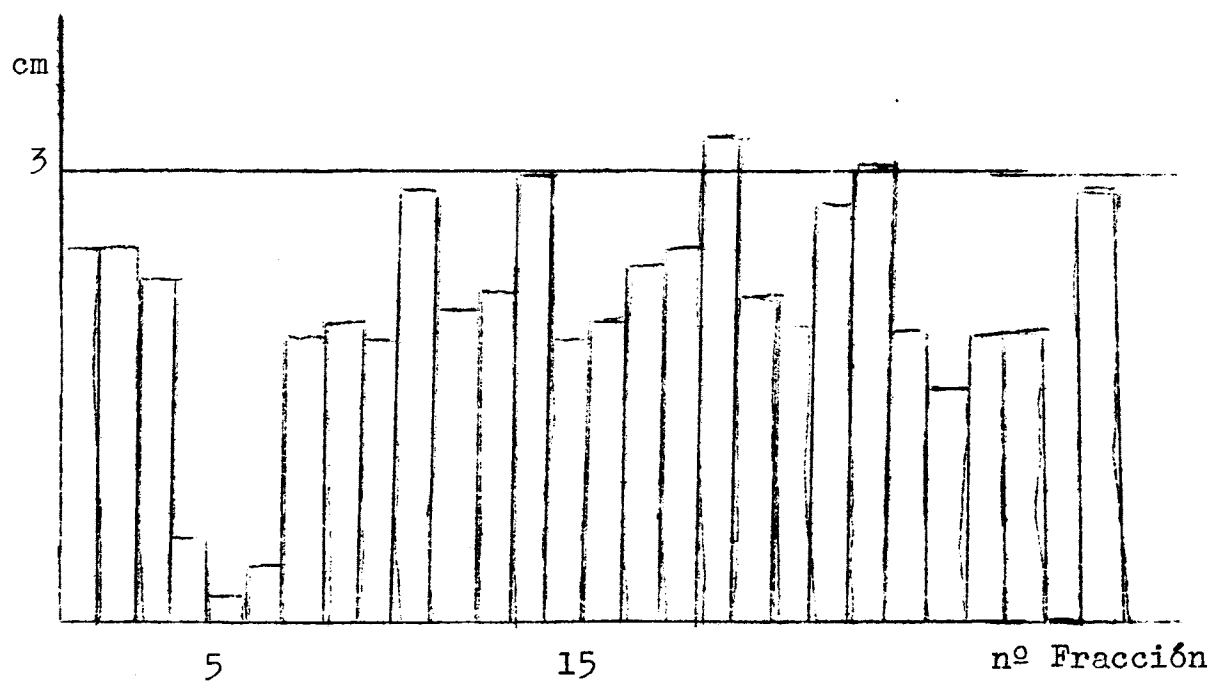
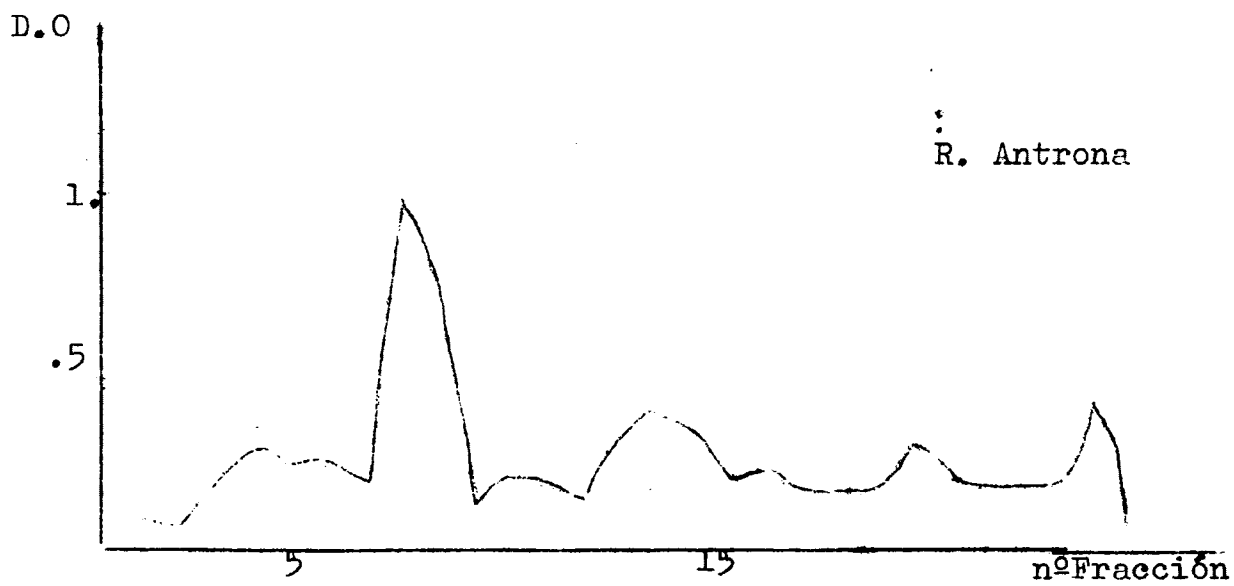
Algunas zonas de inhibición no contienen nitrógeno. Existiendo en algún caso la posibilidad de inhibición osmótica.

II.- Esta cromatografia se realizó a baja temperatura, siguiendo la técnica de Vobeek y Marnetti (27) para separación de fosfolípidos de galactolípidos en dos gramos de extracto disuelto en 10 ml de cloroformo sobre columnas de 65x3 cm cargadas con 150 g de Gel de Sílice 100-200 mesh utilizando para su elución la ayuda de acetona junto a los solventes cloroformo/metanol.

Las fracciones de aproximadamente 50 ml se concentraron a 10 ml. De estas fracciones concentradas se tomaron 0,25 ml para la determinación de hidratos de carbono con reactivo antrona, expresándose los resultados en D.O.

Fracción	Eluyente	Antrona	L.R.	G.G.
1	Clorof/Act 1:1	.10	2,0-3,1	20
2	"	.08	2,3-2,7	24
3	"	.22	2,0-2,7	21
4	"	.31	0,5-0,8	15
5	Acetona	.26	0,1-0,3	11
6	"	.25	0,2-0,6	11
7	"	.18	1,5-2,3	21
8	"	1.00	1,8-2,3	20
9	"	.76	1,8-2,0	23
10	Clorof/Met 9:1	.14	2,8-3,0	19
11	"	.21	1,7-2,5	22

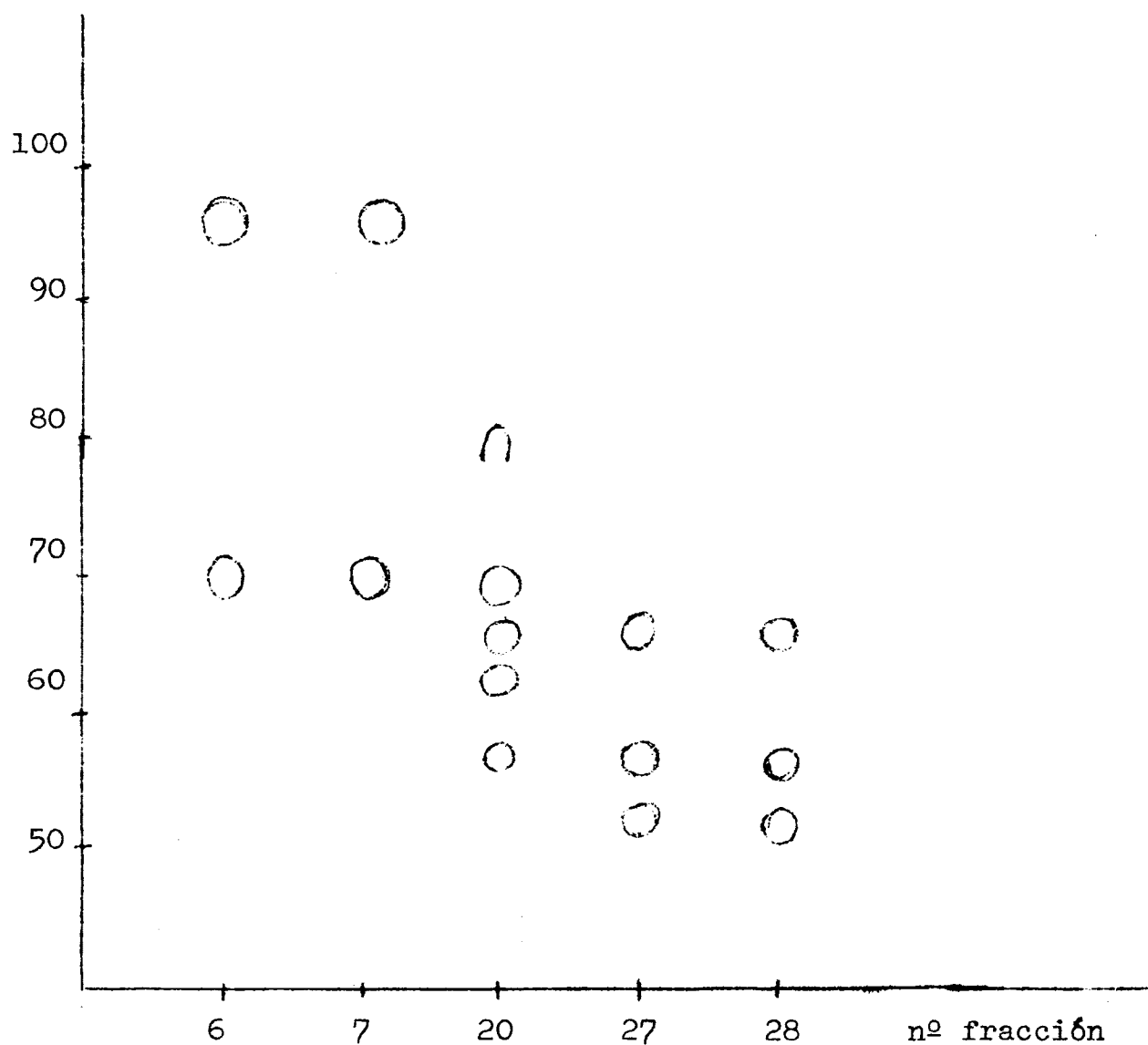
12	Clorof./Met 9:1	.20	2,0-2,5	24
13	"	.15	2,9-3,1	25
14	"	.33	1,2-2,6	24
15	Clorof./Met 4:1	.41	1,7-2,4	21
16	"	.35	1,9-3,0	17
17	"	.20	2,0-3,0	21
18	"	.22	3,0-3,5	20
19	Clorof./Met 1:1	.19	1,3-3,0	23
20	"	.19	1,5-2,5	21
21	"	.17	2,6-3,0	23
22	"	.33	2,8-3,3	21
23	"	.22	1,2-2,8	13
24	Metanol	.20	1,5-1,7	19
25	"	.18	1,5-2,4	17
26	"	.20	1,7-2,2	19
27	"	.46	0	0
28	"	.08	2,8-3,0	21
Control	-	-	2,8-3,3	22



Cromatografia en capa fina de algunas de las fracciones.

Eluyente: Cloroformo/Metanol/agua 65:25:4 v/v

Revelador: Dragendorff.



III.- Con el fin de obtener una mejor resolución , la cromatografía se realizó con 1 gramo de extracto disuelto en 5 ml de cloroformo sobre columnas cargadas con ácido silícico activado, utilizando en su elución los solventes cloroformo/ metanol.

Las fracciones recogidas de 5 ml aproximadamente se resolvieron por cromatografía en capa fina reuniendose las que mostraban manchas comunes.

La determinación de fosforo corresponde a 1 ml del eluido expresandose los resultados en densidades opticas.

Fracción	Eluyente	Fosforo	Fracción	Eluyente	Fosforo
1	Cloroformo	.018	13	Cloroformo	.080
2	"	.025	14	"	.040
3	"	.022	15	"	.065
4	"	.030	16	"	.065
5	"	.040	17	"	.170
6	"	.015	18	"	.150
7	"	.030	19	"	.260
8	"	.035	20	"	.220
9	"	.025	21	Clorof/Met 9:1	.070
10	"	.025	22	"	.130
11	"	.050	23	"	.080



25	Clorof/Met 9:1	.085	47	Clorf/Met 9:1	.320
26	"	.050	48	"	.265
27	"	.065	49	"	.265
28	"	.090	50	"	.210
29	"	.065	51	"	.195
30	"	.020	52	Clrf/Met 4:1	.215
31	"	.045	53	"	.325
32	"	.025	54	"	.319
33	"	.040	55	"	.320
34	"	.020	56	"	.300
35	"	.015	57	"	.265
36	"	.010	58	"	.300
37	"	-	59	"	.260
38	"	-	60	"	.379
39	"	-	61	"	.365
40	"	-	62	"	.205
41	"	-	63	"	.190
42	"	-	64	"	.182
43	"	-	65	"	.215
44	"	-	66	"	.205
45	"	.800	67	"	.342
46	"	.630	68	"	1.000

69	Clof/Met 4:1	1.000	91	"	.
70	"	1.000	92	"	.480
71	"	.850	93	"	.420
72	"	.690	94	"	.380
73	"	.580	95	"	.280
74	"	.540	96	"	.245
75	"	.465	97	"	.340
76	"	.420	98	"	.297
77	"	.480	99	"	.210
78	"	.680	100	"	.170
79	"	.420	101	"	.185
80	"	.520	102	"	.750
81	"	.555	103	"	.680
82	"	.542	104	"	.350
83	"	.605	105	"	.318
84	"	.660	106	"	.280
85	"	.850	107	"	.219
86	Clof/Met 1:1	.110	108	"	.230
87	"	.890	109	"	.270
88	"	.670	110	"	.270
89	"	.740	111	"	.210
90	"	.630	112	"	.165

113	Clorf/Met 1:1	.188	136	Metanol	.950
114	"	.095	137	"	.760
115	"	.082	138	"	.600
116	"	.120	139	"	.520
117	"	.095	140	"	.850
118	"	.260	141	Met/AcH 5%	2.000
119	Metanol	.500	142	"	.320
120	"	.505	143	"	.050
121	"	.560	144	"	.070
122	"	.480	145	"	.075
123	"	.460	146	"	.075
124	"	.380	147	"	.200
125	"	-	148	"	.060
126	"	.449	149	"	.340
127	"	.449	150	"	.380
128	"	.175	151	"	.125
129	"	.160	152	"	.077
130	"	.290	153	"	.110
131	"	.830	154	"	.072
132	"	1.300	155	"	.030
133	"	1.200	156	"	.030
134	"	1.100	157	"	.030
135	"	1.100	158	"	.145

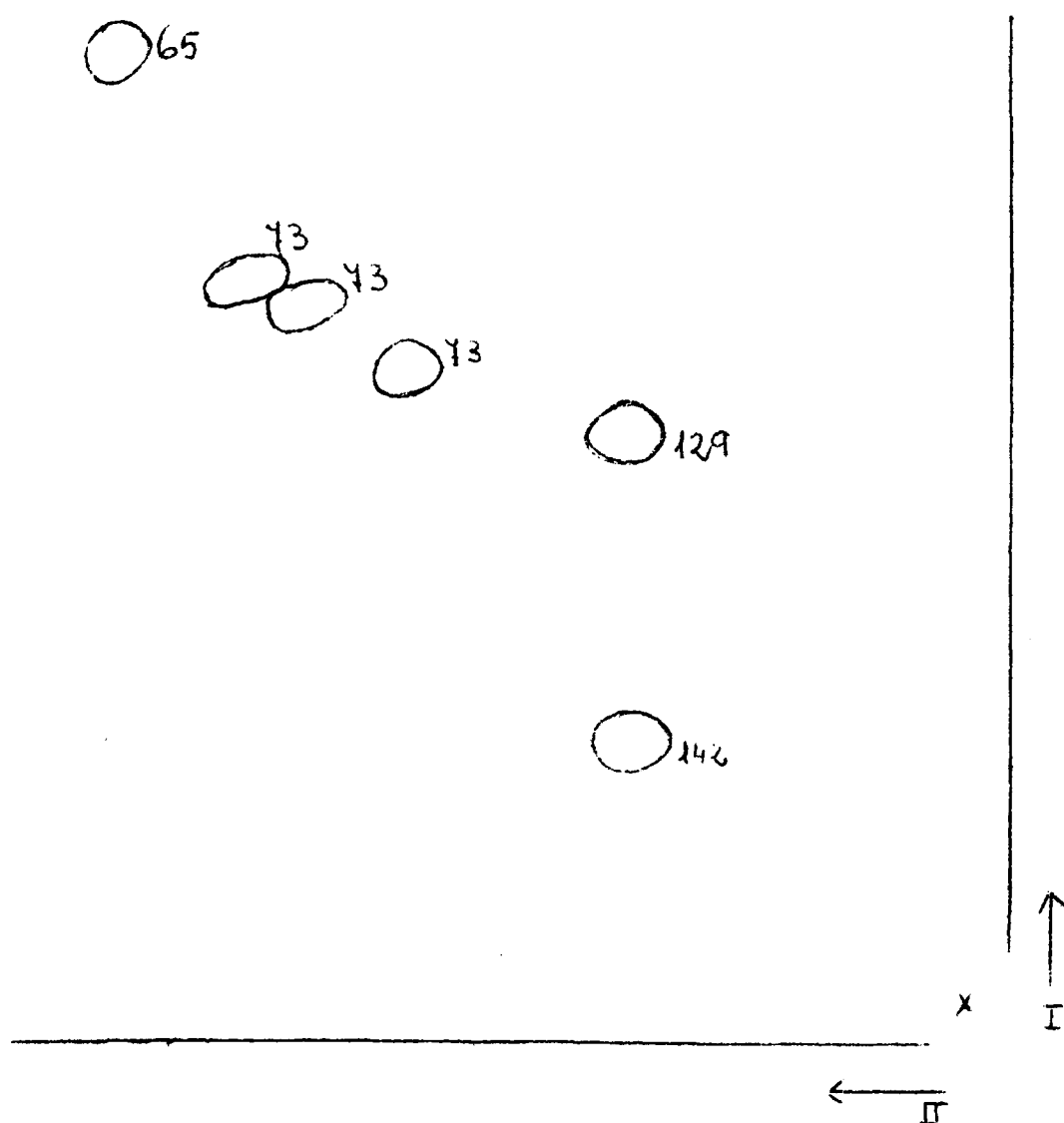
Desarrolladas todas las fracciones en el sistema cloroformo/metanol agua 65:25:4 y revelados con  $I_2$ , luz ultravioleta, Dragendorff modificado, ninhidrina ó difenilamina se agruparon de la forma siguiente.

Fracciones	Rf	Reveladores
1 a 38	frente	U.V.
39 a 50	-	U.V.
51 a 65	47	U.V., $I_2$ , difenilamina
66 a 73	62	$I_2$ , Dragendorff
74 a 82	57 y 62	U.V.(1ª), U.V. y $I_2$ (2ª)
83 a 97	57	U.V., $I_2$ , Dragendorff
98 a 106	57	$I_2$ , ninhidrina
107 a 114	20	$I_2$ , ninhidrina
115 a 129	63	Dragendorff
	25	$I_2$ , Dragendorff

El analisis de la resolución cromatografica de las columnas en capa fina revela que la separación no es buena en cuanto a componentes se refiere. Obteniendose en la separación de galactolipidos de fosfolipidos con acetona en frio alguna mejora. Los ensayos biologicos muestran zonas de inhibición que corresponden en algunos casos con la presencia de sustancias fluorescentes y en otros con compuestos que reaccionan con antrona.

Desarrollo bidimensional en los sistemas I) cloroformo/metanol  
/agua 65:25:4 y II) butanol/Ac. acetico/agua 60:20:20 de las  
fracciones reunidas nº 65, 73 y 129 + 142 .

Revelador : Dragendorff.



## Acción de los hidratos de carbono

### a) Germinación

La germinación se realizó con granos completos de cebada, centeno, trigo y avena sin envolturas externas en cajas/petri con 4 ml de medio nutriente inorganico, más el azúcar correspondiente, en estufa a 18°C durante tres días.

#### Germinación visible

Hidratos de carbono	Cebada	Centeno	Trigo	Avena
D-Manitol	Normal	Normal	Normal	Normal
D-Glucosa	Frenada	Retardada	Frenada	Frenada
D-Sacarosa	Retardada	Normal	Retardada	Retardada
D-Galactosa	Inhibida	Inhibida	Inhibida	Inhibida
L-Arabinosa	Ret. irreg	Ret. irreg	Ret. irreg	Ret. irreg
Melibiosa	Normal	Normal	Normal	Normal
Rafinosa	Normal	Frenada	Normal	Normal
Maltosa	Normal	Normal	Normal	Normal
Lactosa	Normal	Activada	Normal	Normal

La D-galactosa a determinadas concentraciones inhibe marcdamente la germinación.

La germinación irregular debida a la L-arabinosa muestra algun impedimento, probablemente de caracter competitivo.

b) Asimilación

Estas pruebas se realizaron en tubos de ensayo, utilizando embriones con la menor parte posible de endospermo en medios agarificados.

Hidratos de Carbono	Cebada		Centeno		Trigo		Avena	
Longitud cm	R	T	R	T	R	T	R	T
D-Manitol	2,0	2,6	1,3	2,0	2,6	2,3	0,6	0,6
D-Glucosa	4,7	3,3	3,0	3,5	3,2	2,6	2,0	2,0
D-Sacarosa	3,6	2,4	4,5	4,5	3,5	2,4	2,2	1,8
D-Galactosa	0	1,0	0	1,0	0	0,5	0	0,5
L-Arabinosa	2,7	1,8	2,5	3,0	2,0	1,6	0,9	0,9
Melibiosa	2,8	3,4	2,5	4,2	4,0	2,9	2,0	2,4
Rafinosa	3,2	3,6	irrg	irrg	3,7	2,0	2,2	1,7
Maltosa	3,9	4,2	3,6	3,2	3,0	2,1	2,6	1,4
Lactosa	2,7	3,0	2,3	2,5	4,6	4,8	-	-

R.- Raiz

T.- Tallo

La fuerte inhibición de la D-galactosa en el crecimiento de la plántula aparece de forma desigual para sus organos, ya que frente a una casi inhibición total de la raiz se aprecia algun desarrollo del tallo.

c) Efecto de la concentración de galactosa

Las semillas germinaron en cajas/petri con medios basicos inorganicos y distintas concentraciones de D-galactosa/manitol durante cinco dias.

Medios:

I.- Manitol 3,0 %

II.- Manitol 1,5% + Galactosa 1,5%

III.- Galactosa 3,0%

	I		II		III	
Longitud cm	Raiz	Tallo	Raiz	Tallo	Raiz	Tallo
Cebada	2,8-3,0	1,5-2,7	0	0,2-1,4	0	1,4
Centeno	2,2-3,0	1,8-2,8	0	1,0-1,3	0	1,4
Trigo	2,5-5,0	2,4-3,8	0	0,3-1,0	0	1,2
Avena	1,2-2,0	1,1-1,4	0	0,7-1,3	0	1,2



### Prueba respiratoria

Los ensayos corresponden a 10 semillas de avena sin envolturas externas que germinaron en medios con distintas concentraciones de D-galactosa y antibiotico durante veinticuatro y cuarenta y ocho horas.

En los matraces manometricos se adicionó 1 ml del mismo medio germinativo.

Medios :

I.- Manitol 3 %

II.- Manitol 1,5 % + Galactosa 1,5 %

III.- Manitol 2,0 % + Galactosa 1,0 %

IV.- Manitol 2,6 % + Galactosa 0,375 %

#### Veinticuatro horas de germinación

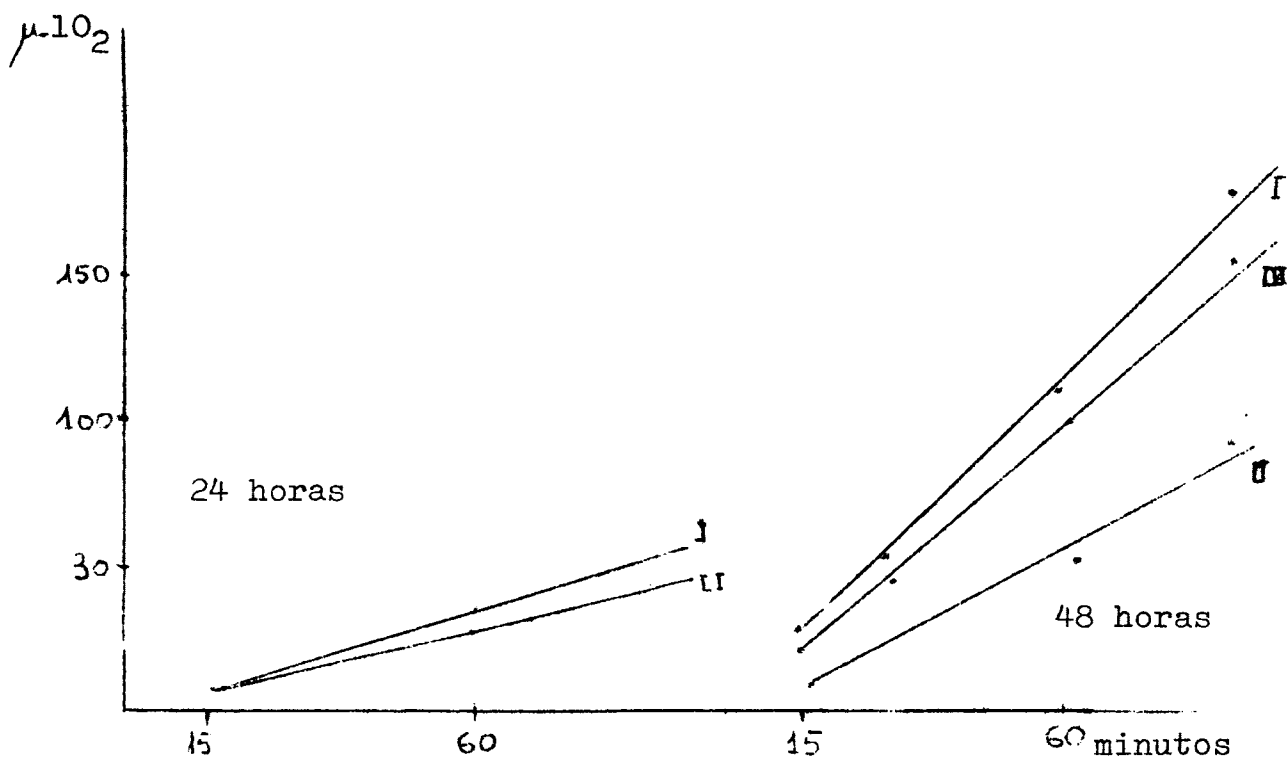
Tiempo - minutos	I $\mu$ l O <sub>2</sub>	I $\mu$ l O <sub>2</sub>	I CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	II $\mu$ l O <sub>2</sub>	II $\mu$ l O <sub>2</sub>	II CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>
15	7,4	13,6	1,84	7,8	12,7	1,62
30	6,7	12,0	1,78	6,0	12,8	2,10
60	21,0	27,0	1,30	15,6	24,5	1,50
90	17,2	22,2	1,30	15,0	20,5	1,40
120	19,6	23,0	1,17	17,4	22,5	1,30

Tiempo - minutos	III $\mu\text{l O}_2$	III $\mu\text{l CO}_2$	III $\text{CO}_2/\text{O}_2$	IV $\mu\text{l O}_2$	IV $\mu\text{l CO}_2$	IV $\text{CO}_2/\text{O}_2$
15	6,5	10,4	1,6	7,2	13,8	1,76
30	7,7	13,8	1,8	7,9	14,7	1,92
60	18,3	24,0	1,3	17,6	25,5	1,44
90	18,3	22,1	1,2	20,0	26,0	1,30
120	17,0	20,7	1,2	20,5	26,9	1,31

Cuarenta y ocho horas de germinación

Tiempo - minutos	I $\mu\text{l O}_2$	I $\mu\text{l CO}_2$	I $\text{CO}_2/\text{O}_2$	II $\mu\text{l O}_2$	II $\mu\text{l CO}_2$	II $\text{CO}_2/\text{O}_2$
15	27,6	35,6	1,29	7,8	19,6	2,5
30	28,2	34,4	1,22	12,6	17,6	1,5
60	58,0	66,5	1,14	28,6	42,4	1,5
90	66,0	75,0	1,13	42,6	57,0	1,3

Tiempo - minutos	III $\mu\text{l O}_2$	III $\mu\text{l CO}_2$	III $\text{CO}_2/\text{O}_2$	IV $\mu\text{l O}_2$	IV $\mu\text{l CO}_2$	IV $\text{CO}_2/\text{O}_2$
15	22,5	32,6	1,46	15,1	21,5	1,42
30	24,5	31,5	1,30	22,4	25,5	1,13
60	47,0	55,0	1,16	48,4	55,8	1,15
90	57,0	63,5	1,11	60,5	69,0	1,14



La inhibición del crecimiento de semillas por efecto de la D-galactosa, puede apreciarse no solo por su germinación visible sino también por su estado respiratorio.

Competición de D-Galactosa con D-Glucosa en el crecimiento  
de embriones

Medios :

- I.- Manitol 3 %
- II.- Glucosa 1,5 % + Galactosa 1,5 %
- III.- Glucosa 2,0 % + Galactosa 1,0 %
- IV.- Glucosa 2,625 + Galactosa 0,375 %
- V.- Glucosa 3 %

	Tercer dia		Noveno dia	
Longitud cm	Raiz	Tallo	Raiz	Tallo
I	1,4-1,9	0,5-1,0	3,4-3,6	0,8-1,0
II	0,4-0,9	2,0-2,5	1,0-1,6	4,3-4,8
III	2,5-3,0	1,0-1,5	5,7-6,2	1,5-1,9
IV	3,0-3,5	2,0-2,5	5,5-6,4	8,8-9,2
V	3,4-3,5	1,7-1,8	6,5-7,1	7,5-8,0

VII.- ESTUDIO DEL HETEROGLUCOSIDO

" TIPO IRIDOIDE "

## Extracción de los heteroglucosidos

### a) Semillas.-

Los extractos metanolicos/acuosos de las semillas de la planta *Euphrasia rubra* contienen agentes inhibidores de la germinación y del crecimiento, facilmente observables en las pruebas germinativas a distintas concentraciones.

Separados los compuestos por cromatografia en capa fina me diante el sistema cloroformo/metanol 85:15 se pueden apreciar tres tipos de compuestos.

- 1.- manchas marron oscuro con Rfs, .10 y .48
- 2.- manchas fluorescentes azules con Rfs .52 y .60
- 3.- manchas amarillas con Rfs .41 y .76

### b) Plantas.-

Debido a la dificultad de la recolección en cantidad de se millas tan pequeñas se prefirió trabajar con la planta completa.

## Prueba germinativa

La germinación se realizó con granos completos de cebada en cajas/petri, en medios de concentraciones decrecientes de los extractos cloroformicos obtenidos de la planta " *Odonti-* tis rubra".

<u>Concentración</u> <u>( % gramos)</u>	<u>Granos</u> <u>germinados</u> <u>(%)</u>	<u>Longitud</u> <u>de la raíz</u> <u>(cm)</u>	<u>Observaciones</u>
3,0	-	-	Inh. total
1,5	-	-	Inh. total
0,75	20	0,3	Inh. parcial
0,375	55	0,8	Inh. parcial
0,187	70	1,2	Inh. parcial
Control	80	2,1	Germ. normal

#### Fraccionamiento cromatografico

El extracto cloroformico de la planta "Euphrasia rubra" se cromatografió en columna de Silica Gel 100-200 mesh con cloroformo, analizando contenido y actividad de las fracciones eluidas al aumentar gradualmente la proporción de metanol.

En la elución con cloroformo/metanol 85:15 se arrastran, en primer lugar, dos bandas, amarilla y amarilla oscura, portadoras de colorantes amarillos y compuestos fluorescentes, recogidas como fracciones III y IV, de caracter ácido.

Inmediatamente despues aparece el glucosido tipo Iridoide, en forma más disociada, recogido en las fracciones V y VI.

Despues se eluyen en menor cantidad otros glucosidos menos disociados, pero conteniendo probablemente aglucones semejantes.

<u>Fracción</u>	<u>Compuesto principal</u>	<u>Prueba germinativa</u>	<u>AIA-oxidasa</u>	<u>Cantidad de la mezcla (%)</u>
III	Colorantes Comp. fluo.	Inhibición	Inh. fuerte	2,5
IV	Comp. fluo.	Inh. fuerte	Inhibición Form. compl.	5,0
V	Glucosido. Tipo Irid.	Inh. fuerte	Form. compl.	12,9
VI	Glucosido Tipo Irid.	Inh. fuerte	Form. compl.	12,0
VII	Otros gluc.	Inh. debil	Inerte	7,0
VIII	Otros gluc.	Inerte	Inerte	3,0

#### Naturaleza del glucosido "tipo Iridoide" más disociado

Este glucosido se eluye de las columnas mezclado con otras sustancias, especialmente con un compuesto fluorescente azul oscuro.

Por cromatografía en placas preparativas desarrolladas en el sistema cloroformo/metanol 85:15 ó 80:20 v/v se obtiene una banda superior con debil fluorescencia azul, seguida de otra fluorescente azul oscura.

El glucosido tipo Aucubina, con debil fluorescencia azul, al hidrolizarse en medio ácido se ennegrece, ya que el aglucón, poco estable, se polimeriza rapidamente, dando un producto amor

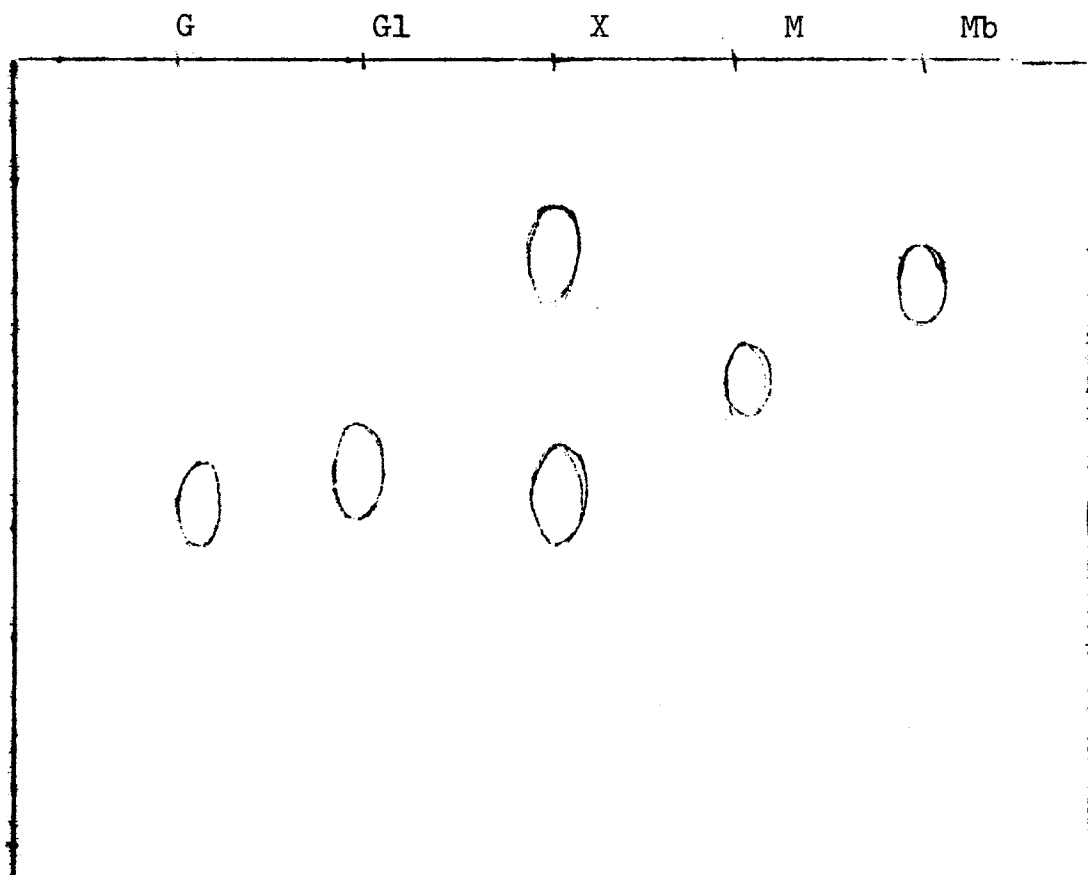


fo negruzco, por lo que reveladas con  $\text{ClH}/\text{FeCl}_3$  y calentamiento a  $100^\circ\text{C}$  da una mancha negra seguida de otra marron oscura.

Su purificación se aprecia mediante los espectros U.V. puesto que este glucosido no presenta absorción en la zona de 310-315 nm, mientras que el compuesto fluorescente oscuro da un maximo de absorción ( $\lambda_{\text{max}}$ . 312 nm) en esta región.

Mediante hidrolisis ácida en metanol a temperatura ambiente pueden extraerse con éter unos compuestos intermedios verdosos con el mismo espectro U.V. que el glucosido. El azúcar liberado es glucosa, según revela la cromatografía en papel desarrollada en el sistema butanol/piridina/agua 6:4:3: v/v.

Operando en medio basico para evitar la polimerización, se logra separar el ácido benzoico en el proceso de saponificación. Previa acidulación, se logra aislar el ácido benzoico puro por arrastre de vapor.



G : Glucosa  
Gl : Galactosa

X : Sustancia hidrolizada  
M : Maltosa  
Mb : Melibiosa

### Derivado acetilado

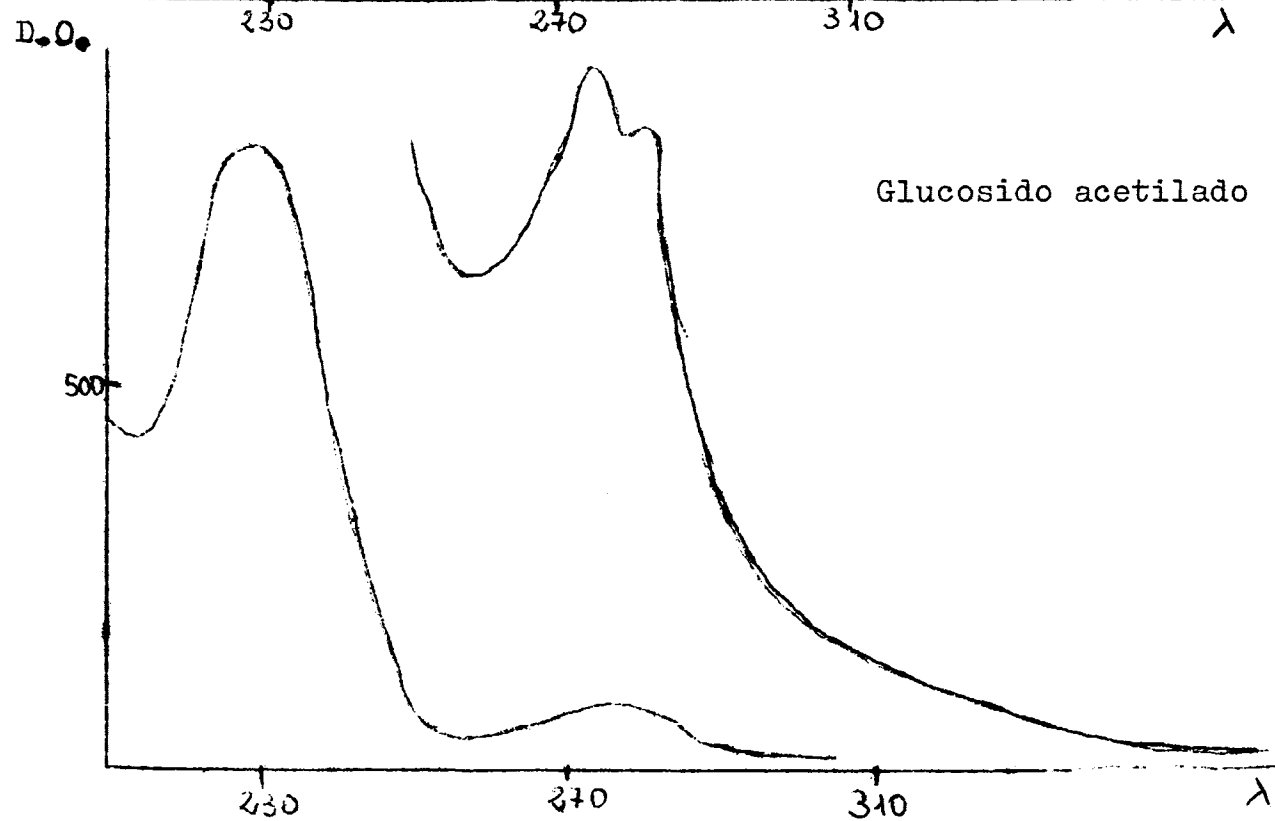
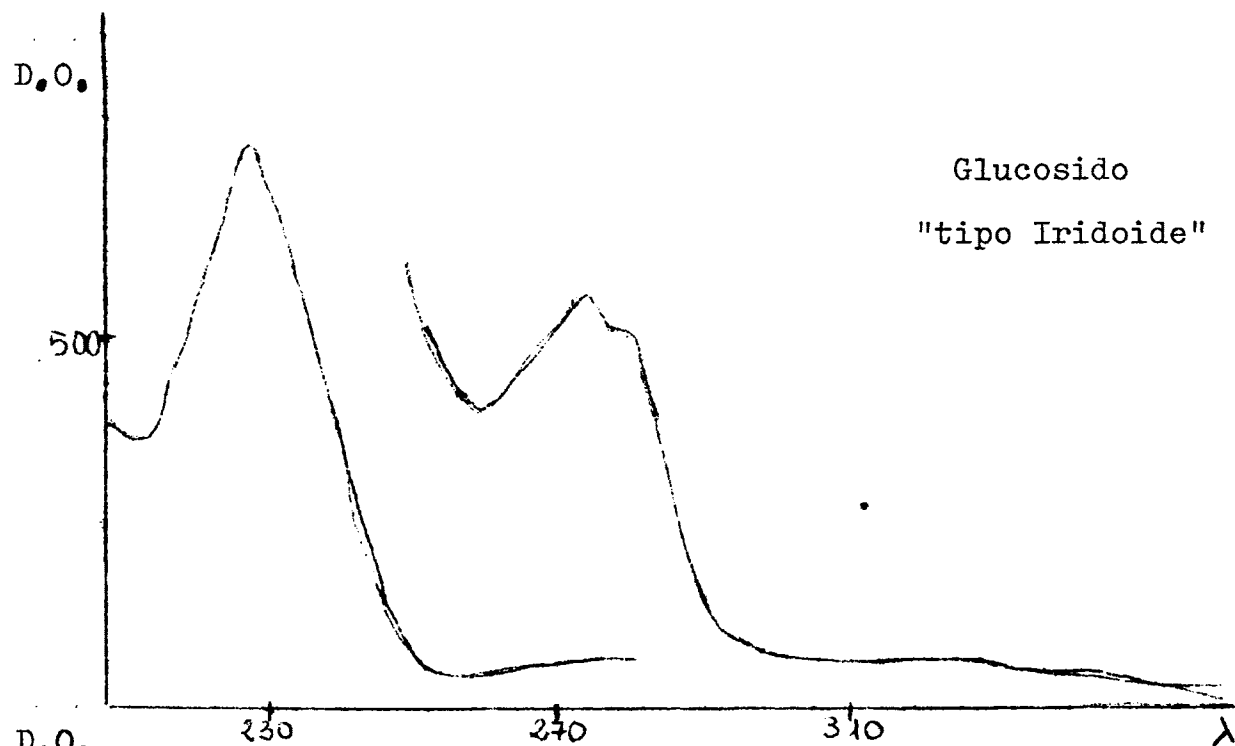
Separado este glucosido "tipo Iridoide" se acetila con anhidrido acético en piridina.

El glucosido de la planta Euphrasia rubra dá un compuesto que recristalizado en metanol/agua funde a 72-74 °C.

Su cromatografia en capa fina con el sistema acetato de etilo/hexano 1:1 nos revela que el compuesto acetilado con Rf .47 presenta alguna impureza fluorescente con Rf .097. Recristalizado varias veces en etanol/hexano dá un compuesto con P.F. 87 °C.

El compuesto acetilado de la planta " Odontitis rubra" recristalizado en metanol/agua dá un compuesto puro de P.F. 84°C y con el mismo Rf .47 .

La identidad de los espectros ultravioletas de estos derivados acetilados, similares al del glucosido ( $\lambda_{max}$  229 y 274 nm), nos hace considerar que este Principio Activo es comun para las dos plantas.



# Efecto inhibidor del glucosido en el crecimiento de la raiz

Embriones de cebada germinando durante dos dias a 20 °C.

<u>Medios</u>	<u>Concentraciones finales de los reguladores</u>
I	Sol. tamponada de fosfatos 22 mM a distintos pHs
II	0,5 g de glucosido/100 ml de sol. tamponada
III	0,25 g de glucosido/100 ml de sol. tamponada
IV	0,125 g de glucosido/100 ml de sol. tamponada

pH Medios	4,7		5,6		6,8		7,8	
	G.G %	L.R cm	G.G %	L.R cm	G.G %	L.R cm	G.G %	L.R cm
I	90	1,4	90	1,6	90	1,6	85	1,3
II	55	0,6	65	0,5	60	0,7	55	0,5
III	75	1,2	65	0,9	65	1,1	85	1,3
IV	80	1,4	85	1,4	75	1,3	85	1,5

G.G. - Granos germinados

L.R. - Longitud de raiz

### Acción del glucosido como agente frenante

Germinación de 50 granos de cebada durante tres días.

<u>Medios</u>	<u>Concentraciones finales de los reguladores</u>
I	Sol. tamponada de fosfatos 22 mM pH 6,8
II	Sol tamponada de ác. giberelico $2,5 \cdot 10^{-5}$ M
III	Sol. tamponada de ác. giberelico $2,5 \cdot 10^{-5}$ M
	Glucosido 0,5 g/100 ml
IV	0,5 g de glucosido/100 ml de sol. tamponada

Extracto acuoso: Maceración de 25 granos germinados en 100 ml

KCl 0,15 M y centrifugación.

### Actividad amilolitica total

Mezcla de reacción : 1 ml de extracto acuoso más 1 ml de solución  $\text{CaCl}_2$  0,2 M y 2 ml de almidón tamp.

Medios	I	II	III <sub>0</sub>	III <sub>1</sub>	IV
L.R. cm	2-2,5	2,5-3,0	1-1,5	1,5-2,0	1,0-1,5
Tiempo min.	D.O.				
5	.57	.51	.60	.56	.64
10	.13	.08	.21	.12	.32
30	-	-	.01	-	.03

III<sub>0</sub> y III<sub>1</sub> indican que el compuesto frenante se adicionó a cero y un día de germinación.

### Actividad diastásica

Medios	I	II	III <sub>0</sub>	III <sub>1</sub>	IV
meq. tiosulf/ml	2,32	2,64	2,08	2,40	1,80

### Actividad amilolitica ( $\alpha$ -amilasa)

Mezcla de reacción : 1 ml de extracto acuoso más 1 ml  $\text{CaCl}_2$  0,2  
M y 2 ml de almidón tamponado, calentado  
a 70 °C durante 10 minutos.

Medios	I	II	III <sub>0</sub>	III <sub>1</sub>	IV
Tiempo min.	D.O.				
5	.72	.70	.75	.73	.84
15	.62	.59	.63	.60	.66
30	.38	.31	.34	.32	.50
60	.09	.06	.10	.08	.18

### Efecto directo del compuesto Iridoide con la fitohormona

Iridoide 1 g/500ml	0,5	-	0,5	-
Iridoide 1 g/1000ml	-	0,5	-	0,5
Tampon pH 6,8	1,75	1,75	2,5	2,5
AIA 200 $\mu$ /ml	0,75	0,75	-	-
D.O. 535 nm	.1	.25	.02	.40

Acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

esquema experimental									
Extracto	1	1	-	1	1	1	1	-	-
Iridoide 1 g/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tampon pH 5,6	2,5	2,5	3,5	-	-	-	-	-	-
Tampon pH 6,8	-	-	-	2,5	2,5	-	-	-	-
Tampon pH 7,8	-	-	-	-	-	2,5	2,5	-	-
AIA200 $\mu$ /ml	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,3%	1	-	1	1	-	1	-	-	-

Tiempo min.	D.O. 535 nm								
5	.20	.21	.20	.21	.21	.21	.22	.17	.38
10	-	.21	-	-	.20	-	.21	-	-
15	.11	.22	.21	.13	.20	.18	.22	-	-
30	.08	.22	.19	.13	.21	.17	.21	-	-
60	.08	.22	.18	.13	.21	.16	.21	-	-



## Estudio del heteroglucosido en relación con el transporte activo

Actividad ATP-ásica.-

Tris/ClH pH 7	1	1	1	1	1	1
MgCl <sub>2</sub> 0,01 M	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Fracción I	-	-	0,1	0,2	-	-
Fracción II	-	-	-	-	0,1	0,2
Extracto	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
H <sub>2</sub> O	0,4	0,2	0,1	-	0,1	-
ATP 0,02 M	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Ac. perclórico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$\frac{\mu\text{moles } P_i}{1 \text{ ml. min.}} \cdot 10^6$	1430	1530	1530	1532	1450	1480

Fracción I.- Glucosido de la planta Euphrasia rubra

Fracción II.- Glucosido de la planta Odontitis rubra

Extracto .- Extracto enzimático purificado en Sephadex G-50

De los resultados obtenidos en la germinación de los granos de cebada, este compuesto parece apropiado como agente frente del crecimiento en maltería, ya que a bajas concentraciones inhibe notoriamente el crecimiento de las plántulas sin disminuir sensiblemente las actividades amilolíticas y diastásicas. Concretamente la actividad diastásica media de la mate

ria reductora es un poco menor, mientras que la actividad amilolítica valorando especialmente  $\alpha$ -amilasa es del mismo orden que en la germinación normal.

El estudio de estos compuestos en la formación de complejos moleculares nos muestra que su interacción con la fitohormona a concentraciones de 1 g/500 ml, da valores constantes e inhibe la reacción enzimática AIA-oxidasa. El agua oxigenada no desenmascara a la fitohormona y al parecer activa la reacción. Poniéndose de manifiesto que el compuesto Iridoide aislado no se comporta como los compuestos difenolicos, aunque pudiera tener alguna afinidad con la auxina.

Las fracciones I y II obtenidas de los extractos acuosos de las plantas Euphrasia rubra y Odontitis rubra no muestran inhibición de la actividad ATP-asa en extractos de raíces purificados en Sephadex G-50. Incluso la Ouabaina muestra una ligera acción inhibidora (5%), lo que demuestra que las ATP-ases presentes en las raíces de los cereales son distintas de las descubiertas por Skou o al menos su participación es pequeña.

## Actividad ATP-ásica en las raíces de los cereales

### Purificación del sistema enzimático

#### a) Cromatografía

10 ml de extracto crudo (5 g de raíces frescas de cebada/  
20 ml de KCl 0,15 M) en columnas cargadas con Sephadex G-200.

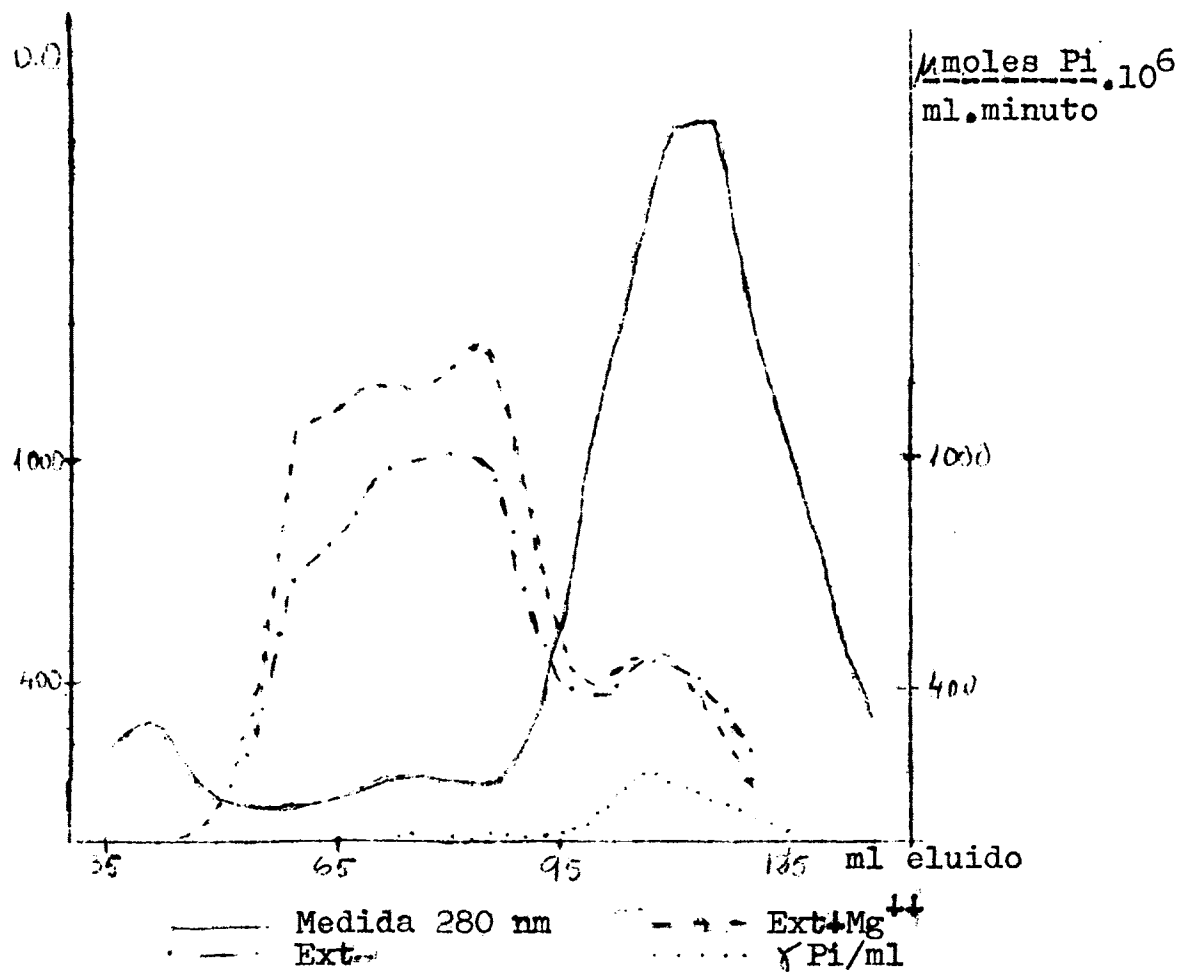
La reacción enzimática de las fracciones eluidas se realiza  
según esquema, expresandose los resultados en ( $\mu$ mòles Pi/  
ml..minuto). $10^6$  .

esquema experimental		
Tris/ClH 0,1 M	1 ml	1 ml
Extracto	0,8 "	0,8 "
MgCl <sub>2</sub> 0,02 M	-	0,1 "
H <sub>2</sub> O	0,1 "	-
ATP 0,02 M	0,1 "	0,1 "

Eluido - ml	Actividad ATP-ásica		Proteínas $\gamma$ /ml	Fosforo inorganico $\gamma$ /ml	D.O.	
	Ext.	Ext+Mg <sup>++</sup>			260nm	280nm
35	0	0	169	0	.267	.240
40	0	0	206	0	.340	.305
46	0	0	152	0	.205	.177

45	0	0	152	0	.205	.240
50	133	129	152	0	.084	.087
55	347	358	152	0	.097	.097
60	739	1099	187	0	.097	.097
65	798	1144	206	0	.092	.104
70	981	1232	260	0	.152	.157
75	996	1193	239	0	.157	.157
80	1035	1247	239	0	.153	.152
85	996	1331	239	0	.149	.144
90	621	986	318	0	.334	.275
95	404	428	458	14	.820	.650
100	394	419	693	54	1.600	1.200
105	487	493	elevado	178	2.000	1.600
110	478	478	elevado	172	2.000	1.900
115	355	379	elevado	130	2.000	1.900
120	236	236	500	77	2.000	1.400
125	-	-	316	26	1.650	1.070
130	-	-	152	19	.830	.650
135	-	-	100	-	.600	.350

Los graficos representan los resultados en densidades opticas y  $\mu\text{moles Pi/ml. minuto}$  frente a ml de eluido.



La zona de máxima actividad en presencia de Mg<sup>++</sup> muestra dos pequeños maximos que pudieran indicarnos la presencia de distintas ATP-~~asas~~.

### Efecto de pH y temperatura

Las fracciones eluidas correspondientes a 50 y 60 ml del extracto crudo purificado en Sephadex G-50, se reunieron constituyendo así el extracto purificado. Observándose los efectos de pH y temperatura sobre actividad enzimática según el esquema siguiente.

esquema experimental	
Tampon Tris/ClH 0,1M	1 ml
Ext purificado G-50	0,5 "
H <sub>2</sub> O	0,4 "
ATP 0,02 M	0,1 "

pH	4	5	6	6,5	7	7,5	8	9
$\frac{\mu\text{moles Pi}}{\text{ml} \cdot \text{minuto}} \cdot 10^6$	97	100	260	390	390	240	70	32

Temperatura °C	22	28	35	40	50
$\frac{\mu\text{moles Pi}}{\text{ml} \cdot \text{minuto}} \cdot 10^6$	285	295	280	255	210

Estos extractos presentan actividad ATP-ásica óptima a pHs 6,5 a 7 y 28 °C de temperatura, siendo activados no solamente por  $\text{Mg}^{++}$  sino también por  $\text{Ca}^{++}$ .

### Activación por iones metálicos

Con la adición de  $Mg^{++}$  ó  $Ca^{++}$  se observó un aumento en la actividad enzimática del sistema.

		$\frac{\mu\text{moles Pi}}{\text{ml. minuto}} \cdot 10^6$				
ion \ mM		100	10	1	0,1	0
$Mg^{++}$		347	393	419	393	301
$Ca^{++}$		334	379	406	400	-

La actividad enzimática significativamente más elevada cuando se adiciona  $Mg^{++}$  ó  $Ca^{++}$  (1 mM), presenta el mismo pH óptimo.

		$\frac{\mu\text{moles Pi}}{\text{ml. minuto}} \cdot 10^6$						
pH		4	5	6	6,5	7	7,5	8
Ext.		87	97	248	392	395	243	56
Ext + $Mg^{++}$		166	177	400	440	420	372	84
Ext + $Ca^{++}$		208	217	347	365	395	327	-

### Efecto de algunos inhibidores

El sistema enzimático es inhibido en presencia de  $Mg^{++}$  y dependiendo de la concentración, por iodoacetato sodico, para-hidroximercuribenzoato y fluoruro sodico.

Inhibidor y conc. de inhibidor	Inhibición %		
	$10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$10^{-3}$
IActNa	82	33	4,5
pHMB	30	16	9,0
NaF	13	-	-

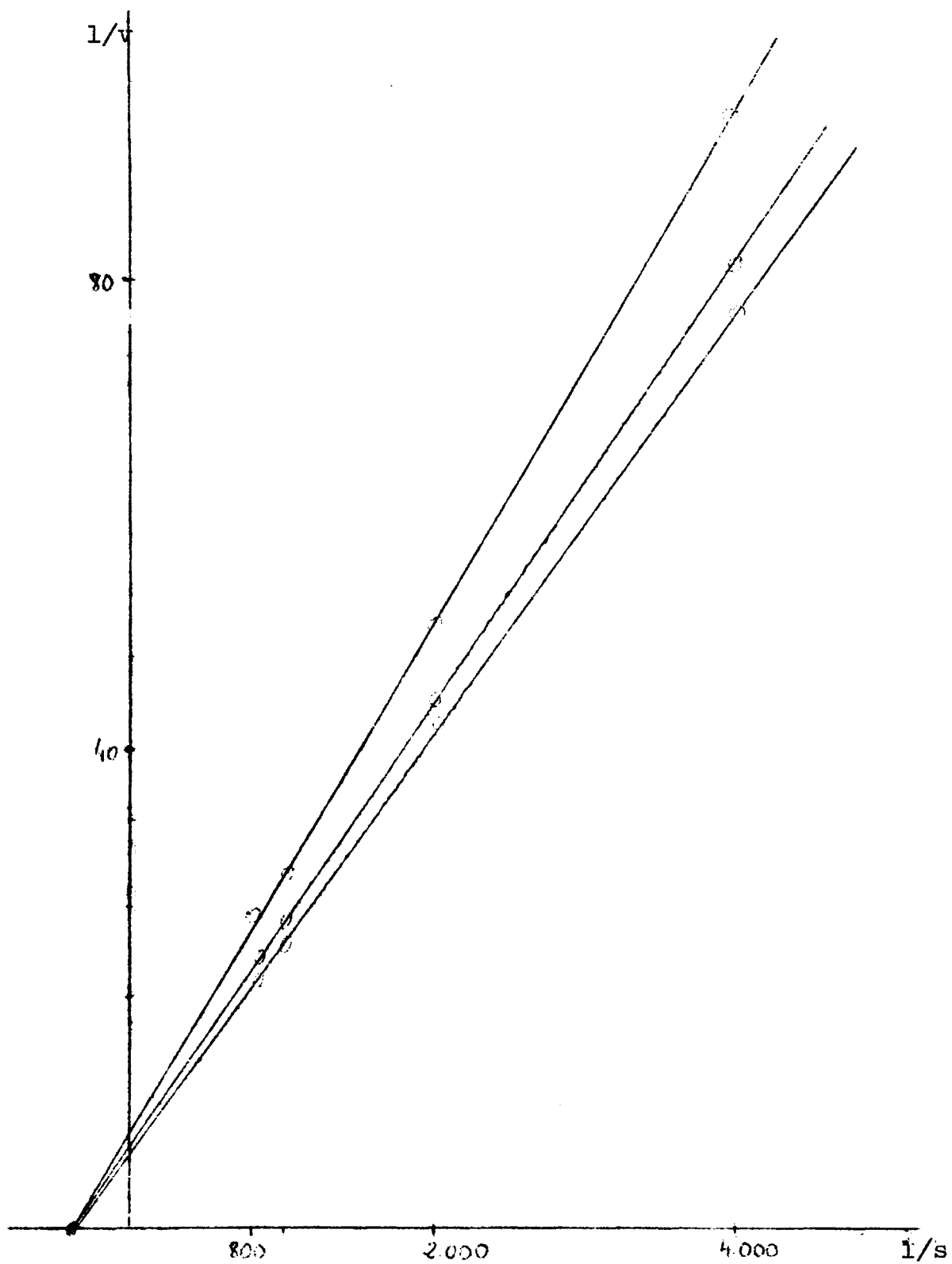
### Cinetica de la reacción enzimática

#### Determinación de $K_m$

La reacción se efectuó por adición de soluciones de ATP a distintas concentraciones, sobre la mezcla de reacción enzimática. Obteniendose un valor para  $K_m$  de  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M.

Medido el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción, en presencia de inhibidores, iodoacetato sódico ( $5 \cdot 10^{-3}$  M) y pHMB ( $10^{-2}$  M), se pudo observar la no alteración de  $K_m$  y sí la reducción de la velocidad máxima, como corresponde a una inhibición no competitiva.





## b) Dialisis

El extracto crudo (5 g de raices frescas disgregadas en 20 ml de agua destilada), en saco de dialisis frente a solución tamponada Tris/ClH 0,1 M pH 7 y EDTA 0,1 M durante 88 horas, constituyó el extracto dializado

Extractos dializados de cebada

	$\frac{\mu\text{moles Pi}}{\text{ml. minuto}} \cdot 10^6$			
ion mM	10	1	0,1	0
Mg <sup>++</sup>	921	1080	832	466
Ca <sup>++</sup>	1140	1210	1080	-

## Acción de inhibidores

Inhibidor y conc. de inhibidor	Inhibición %					
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
Oubaina	5	5	3	-	-	-
Dinitrofenol	-	-	-	4	9	0

Efectos mostrados por distintas concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en presencia de  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Ca}^{++}$  sobre la actividad enzimática.

esquema experimental										
Tris/ClH pH 7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
$\text{MgCl}_2$ 0,02 M	-	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1
$\text{CaCl}_2$ 0,02 M	-	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1
NaCl 1 M	-	-	-	-	0,2	0,2	0,2	-	-	-
KCl 0,2 M	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-
NaCl 2 M	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,2
KCl 0,4 M	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1
Extracto	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
$\text{H}_2\text{O}$	0,6	0,5	0,5	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1
ATP 0,02 M	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
$\frac{\mu\text{moles Pi}}{\text{ml. min.}} \cdot 10^6$	280	910	1220	1040	890	1090	1020	860	1000	910

## Extractos dializados de otros cereales

Efecto de pH en los extractos dializados de cebada, centeno, trigo y avena.

	$\frac{\mu \text{ moles Pi}}{\text{ml. minutos}} \cdot 10^6$					
pH	4	5	6	7	8	9
Cb	260	268	260	281	139	107
Ct	346	335	281	238	118	64
Tr	268	303	260	228	83	64
Av	156	156	148	156	156	116

Efectos de activación de  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Ca}^{++}$

mM	1		0,1		0,01		0	
iones	$\text{Mg}^{++}$	$\text{Ca}^{++}$	$\text{Mg}^{++}$	$\text{Ca}^{++}$	$\text{Mg}^{++}$	$\text{Ca}^{++}$	$\text{Mg}^{++}$	$\text{Ca}^{++}$
Cb	1080	1210	832	1080	-	-	466	-
Tr	496	718	386	625	286	402	232	-
Av	142	167	199	212	206	212	219	-

Activadores metálicos

	$\frac{\mu\text{moles Pi}}{\text{ml. minuto}} \cdot 10^6$							
pH	6				7			
	Cb	Ct	Tr	Av	Cb	Ct	Tr	Av
Ext.	260	281	281	156	273	238	228	161
Ext+Mg <sup>++</sup>	536	774	750	156	710	522	619	110
Ext+Ca <sup>++</sup>	541	750	763	90	678	536	697	116
Ext+Fe <sup>++</sup>	268	501	455	77	339	273	292	84
Ext+Fe <sup>+++</sup>	43	59	54	52	429	378	339	123
Ext+Mn <sup>++</sup>	498	726	697	110	643	563	389	103
Ext+Zn <sup>++</sup>	455	809	787	84	442	455	442	56
Ext+Cd <sup>++</sup>	493	351	643	116	563	429	509	103
Ext+Ni <sup>++</sup>	442	501	493	135	423	356	281	123
Ext+Co <sup>++</sup>	552	787	774	123	619	541	477	103
Ext+Cu <sup>++</sup>	228	346	388	43	268	214	238	79
Ext+Ba <sup>++</sup>	268	260	238	169	322	260	238	135
Ext+B <sup>+++</sup>	238	228	214	-	260	228	214	116
Ext+Al <sup>+++</sup>	-	214	203	-	292	281	281	129

Interacción entre algunos iones

pH 7	Ob	Ct	Tr	Av
Ext	150	150	182	161
Ext+Mg <sup>++</sup>	268	429	541	110
Ext+Ca <sup>++</sup>	193	442	659	119
E+Ca <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	193	536	589	113
E+Fe <sup>++</sup>	182	182	238	77
E+Fe <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	161	238	281	56
Ext+Fe <sup>+++</sup>	260	228	370	144
E+Fe <sup>+++</sup> +Mg <sup>++</sup>	321	370	429	103
Ext+Mn <sup>++</sup>	228	477	384	109
E+Mn <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	193	455	466	110
Ext+Zn <sup>++</sup>	182	335	429	43
E+Zn <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	171	268	273	36
Ext+Cd <sup>++</sup>	321	339	501	100
E+Cd <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	273	339	466	103
Ext+Co <sup>++</sup>	129	429	429	103
E+Co <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	129	480	356	110
Ext+Cu <sup>++</sup>	83	113	204	73
E+Cu <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	107	273	281	73
Ext+Ba <sup>++</sup>	171	171	161	119
E+Ba <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	249	501	589	103
Ext+E <sup>+++</sup>	129	106	129	103
E+B <sup>+++</sup> +Mg <sup>++</sup>	384	429	509	84

pH 6	Cb	Ct	Tr	Av
Ext	292	150	268	170
Ext+Mg <sup>++</sup>	804	498	678	149
Ext+Ca <sup>++</sup>	743	431	731	128
E+Ca <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	830	488	777	130
Ext+Fe <sup>++</sup>	611	412	498	65
E+Fe <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	654	442	456	65
Ext+Fe <sup>+++</sup>	67	40	59	50
E+Fe <sup>+++</sup> +Mg <sup>++</sup>	64	54	59	57
Ext+Mn <sup>++</sup>	777	536	678	123
E+Mn <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	785	555	678	130
Ext+Zn <sup>++</sup>	782	477	763	57
E+Zn <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	804	498	356	50
Ext+Cd <sup>++</sup>	721	431	541	107
E+Cd <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	664	498	536	97
Ext+Co <sup>++</sup>	763	541	731	117
E+Co <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	782	541	743	123
Ext+Cu <sup>++</sup>	182	113	389	32
E+Cu <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	225	134	412	49
Ext+Ba <sup>++</sup>	246	171	171	170
E+Ba <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup>	777	536	650	162
Ext+B <sup>+++</sup>	236	80	225	123
E+B <sup>+++</sup> +Mg <sup>++</sup>	743	442	630	117

En extractos dializados se apreció que el aumento de la actividad por el  $\text{Ca}^{++}$  podía compensarse con concentraciones de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ .

En el estudio de la actividad conjunta en los distintos cereales se aprecian diferencias considerables, lo que permite acusar la especificidad nutritiva de cada planta respecto a los distintos cationes y pHs.

Los fenómenos de sinergia y antagonismo a nivel de iones se producen ya en los fenómenos de absorción.

El antagonismo Fe/Mn y en general entre iones metálicos diversos es típico y provoca carencia inducida.

Si en el caso Fe/Mn se ha pensado que el exceso de Mn mantiene al Fe en estado ferrico, forma inactiva en la planta, es difícil explicar el antagonismo de Fe con otros iones metálicos.



CONCLUSIONES

1º Se confirma que la conjugación en el malteado, de la acción activante del ácido giberelico con la acción de frenantes apropiados dá resultados positivos.

2º La utilización de columnas de Sephadex G-50 nos permitieron la observación rápida de los cambios generales ocurridos durante la germinación.

3º El ácido giberelico a concentraciones externas del orden de  $2 \cdot 10^{-5}$  M activa la germinación y paralelamente la actividad de  $\alpha$ -amilasa.

4º En los lipidos de reserva se aprecia que los trigliceridos acumulados en el endospermo disminuyen durante el primer día de germinación.

5º En la separación bidimensional de los lipidos polares se detectan cuatro zonas típicas. La determinación cuantitativa de fosforo de estas zonas revela fuerte disminución de lisofosfatidilcolina y aumento de fosfatidilcolina durante la germinación.

6º En los extractos de tallos de plántulas de cebada se observa un mayor contenido de fenoles que en los de raíz.

7º Los extractos crudos de raíz y tallo de cebada muestran actividad AIA-oxidasa, mientras que los de centeno y trigo requieren la eliminación de sustancias inhibidoras.

8º La actividad AIA-oxidasa de la fracción proteica se refuerza en presencia de cofactores fenolicos a concentraciones adecuadas y de  $Mn^{++}$  como activador.

9º El fraccionamiento del extracto crudo por cromatografía en columna de Sephadex G-50 separa con claridad la parte proteica y con menor precisión los demás cofactores. Observandose paralelismo en las actividades AIA-oxidasa y peroxidasa de los eluidos correspondientes a la purificación de la fracción proteica en Sephadex G-200.

10º El pirogalol en su efecto directo con el ácido indol-3-acético requiere concentraciones del orden de  $5 \cdot 10^{-3}$  para la formación del complejo, dependiendo poco del pH. En presencia del extracto enzimático se observan diferentes comportamientos en relación a las variaciones de pH en el medio y concentraciones de pirogalol.

11º El agua oxigenada activando los procesos enzimáticos oxidativos de los polifenoles, permite el desenmascaramiento de la fitohormona del complejo.

12º En la cebada y avena la eliminación de sus envolturas externas favorece la germinación.

13º La D-galactosa al 1,5 por ciento inhibe fuertemente el crecimiento de las plántulas, aunque de forma desigual para

sus dos organos. Inhibición total para la raíz y algun desarrollo del tallo.

14º La D-galactosa compite con la D-glucosa en las pruebas de asimilación, dependiendo su efecto de la relación entre ambos hidratos de carbono.

15º Los letargos profundos que muestran las semillas de las plantas Euphrasia rubra y Odontitis rubra de la familia de las Escrofulariaceas, parece estar relacionado con el contenido de sustancias conservadoras del tipo Iridoide.

16º De estas plantas se ha aislado un compuesto nuevo tipo Aucubina benzoilado, junto con otros Iridoides en menor cantidad.

17º El derivado acetilado del compuesto benzoilado cristalizado de metanol/agua funde a 84 °C y su espectro ultravioleta presenta máximos a 229 y 274 nm.

18º Estos compuestos parecen apropiados como agentes frenantes del crecimiento ya que a bajas concentraciones inhiben notoriamente el crecimiento de las plantulas sin disminuir sensiblemente las actividades amiloliticas y diastásicas.

19º Concentraciones del orden de 1 g / 500 ml de este compuesto inhibe parcialmente la reacción enzimática AIA-oxidasa, pero no muestra inhibición en la actividad ATP-asa.

20º La actividad ATP-ásica en los extractos de raíces de los distintos cereales es activada por  $Mg^{++}$  y por  $Ca^{++}$ . El pH óptimo de la reacción enzimática es para la cebada de 6,5 a 7 y para el centeno y trigo de 4 a 4,5 .

21º De los iones ensayados, los divalentes presentan aumento en la actividad ATP-ásica, excepto  $Cu^{++}$  y  $Ba^{++}$ , en tanto que los trivalentes  $B^{+++}$  y  $Al^{+++}$  no afectan sensiblemente. Destacando el ion  $Fe^{+++}$  que muestra distintos efectos según el pH e inhibe marcadamente a pH 6.

22º Los extractos enzimáticos de avena presentan en general un comportamiento diferente frente a los iones probados que el observado en los otros cereales.



## BIBLIOGRAFIA

- 1 Come, D.: Les obstacles a la germination. Masson.Cie.  
Paris(1970)
- 2 Mayer, A.M. y Poljakoff-Mayber, A.: The germination of seeds.  
Pergamon Press.N.Y.(1963)
- 3 Ikuma, H. y Thimann, K.V.: Gen. Physiol. 48,756(1964)
- 4 Brian, F.Bland.: Crop Production Cereals and Legumes.  
Academic Press. London (1961)
- 5 Cook, A.H.: Barley and Malt. Biolgy, Biochem, Techn.(1962)
- 6 Scriban, R.: Ann. Nutr. Alim. 21, B281-B298 (1967)
- 7 Pollock, J.R. y Pools, A.A.: J.Inst.Brew. 64,151 (1958)
- 8 Grabar, P. y Daussant, J.: Am.Inst.Pasteur. 110,79(1966)
- 9 Frydenberg, O. y Nielsen, N.: Hereditas Suede 54, nº 2, 123(1965)
- 10 Srivastava, B.I. y Meredith, W.O.S.: J.Inst.Brew.72,163(1966)
- 11 MacLeod, A.M. y Duffus, J.H.: J.Inst.Brew.72,36 (1966)
- 12 Manners, D.J. y Yelowless, D.: J.Inst.Brew.79,5 (1973)
- 13 Duperón, R.: C.R.Acad.Sci. Paris 241,1817 (1955)
- 14 Mazliak, P.: Le metabolisme des lipides dans les plants su-  
perieures. Masson.Cie.Paris. (1968)
- 15 Ferrari, R.A. y Benson, A.A.: Arch.Biochm.Biophys.93,185(1961)
- 16 Evenari, M.: Symp.Soc.Exp.Bio. 11,21 (1957)
- 17 Bobbit, J.M. y Segebarth, K.P.: The Iridoid Glycosides and  
similar substances of natural origen. Taylor  
y Battersby, M.D. Inc.N.Y. (1969)



- 18 Pilet, P.E. y Gaspar, Th.: Le catabolisme auxinique. Masson.  
Cie. Paris (1968)
- 19 Bastin, M. y Gaspar, Th.: C.R. Acad. Sc. Paris. 260, 4050 (1965)
- 20 Leopold, A.C. y Plummer, T.H.: Plant Physiol. 36, 589 (1961)
- 21 Skou, J.C.: Biochem. Biophys. Acta. 42, 6 (1967)
- 22 Bligh, E.G. y Dyer, W.J.: Can. J. Biochem. Physiol. 39, 311 (1959)
- 23 Hollman, R.T.: Measurement of polyunsaturated fatty acids. Me  
thods of Biochem. Analysis. Vol. IV. Gluck, D.  
Interscience Pub. N.Y. (1967)
- 24 Rouser, G. y Siakotos, A.N. y Fleiseher, S.: Lipids. 1, 85-86  
(1966)
- 25 Sunderwirth, G.: J. Chromatog. 16, 176 (1964)
- 26 MacLeod, A.M.: J. Inst. Brew. 73, 146 (1967)
- 27 Vorberck, M.L. y Marinetti, G.V.: J. Lip. Res. 6, 36 (1965)
- 28 Bastin, R.: Tratado de fisiologia vegetal. (1970)
- 29 Castillon, M.P., Catalan, R.E., Municio, A.M. y Suarez, A.:  
Comp. Biochem. Physiol. 38 B, 109 (1971)
- 30 Garcia Bilbao, J.L.: Revista Ciencia Aplicada. 109, 132 (1964)
- 31 Garcia Bilbao, J.L., Gomez-Cordoves, M.C. y Hernandez Garcia,  
M.T.: Revista Cerveza y Malta. nº 22 (1969)
- 32 Van Sumere, C.F.: Phenolic in plants in health and disease.  
Bridham, J.B. Pergamon Press. N.Y. (1960)

- 33 Garcia Bilbao, J.L., y Hernandez Garcia, M.T.: Revista Cerveza y Malta. nº 30 (1971)
- 34 Garcia Bilbao, J.L. y Hernandez Garcia, M.T.: Revista Cerveza y Malta. nº 35 (1972)
- 35 Kyoko Ohwaki y Lewis, M.S.: J.Inst.Brew. 77,4 (1971)
- 36 Kazuo Ogawa y Hideo Mohri.: Biochem.Biophys.Acta. 142,155 (1972)